

ELÄINLÄÄKETIETEEN LISENSIAATIN TUTKIELMA

BACILLUS ANTHRACIS -BAKTEERIN SÄILYMINEN YMPÄRISTÖSSÄ
- SÄILYMISEEN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT JA NIIDEN MERKITYS SUOMESSA

KIRJALLISUUSKATSAUS

ELK Ilona Tikkanen

Helsingin Yliopiston Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto

Eläinlääketieteellinen mikrobiologia ja epidemiologia

2017

Tiedekunta - Fakultet - Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning - Department Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto
Tekijä - Författare - Author Ilona Tikkanen		
Työn nimi - Arbetets titel - Title <i>Bacillus anthracis</i> -bakteerin säilyminen ympäristössä – säilymiseen vaikuttavat tekijät ja niiden merkitys Suomessa		
Oppiaine - Läroämne - Subject Eläinlääketieteellinen mikrobiologia ja epidemiologia		
Työn laji - Arbetets art - Level Lisensiaatintutkielma	Aika - Datum - Month and year 11/2017	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 63
<p>Tiivistelmä - Referat - Abstract</p> <p>Tämä lisensiaatintutkielma on kirjallisuuskatsaus pernaruttoa aiheuttavan <i>Bacillus anthracis</i> -bakteerin säilymisestä ympäristössä sekä säilymiseen vaikuttavista tekijöistä. Tutkielman tavoitteena oli selvittää, mitkä tekijät vaikuttavat <i>B. anthracis</i> -bakteerin ja itiöiden säilymiseen maaperässä sekä pohtia näiden tekijöiden merkitystä Suomessa. Tavoitteena oli myös tehdä kartta, josta käyvät ilmi pernaruttotaudinpurkaukset Suomessa vuodesta 1940 alkaen. On tärkeää, että pernaruttotapauksista on kartta, jotta eläinlääkärit olisivat tietoisia aiemmista tautitapauksista alueellaan ja osaisivat tarvittaessa epäillä pernaruttotartuntaa. Tutkielman kolmantena tavoitteena oli verrata silmämääräisesti pernaruttotaudinpurkauksista tehtyä karttaa Suomen maaperä- ja tulvariskialuekarttoihin sekä pohtia, miksi pernaruttoa on esiintynyt eniten tietyillä alueilla.</p> <p>Pernarutto on vaarallinen, vastustettava eläintauti ja zoonoosi, jonka leviäminen voi aiheuttaa mittavia taloudellisia tappioita ja uhata myös ihmisten terveyttä. Pernaruttoa aiheuttava <i>Bacillus anthracis</i> pystyy muodostamaan itiöitä, jotka voivat säilyä maaperässä jopa satoja vuosia. Maaperän ominaisuudet vaikuttavat siihen, kuinka hyvin <i>B. anthracis</i> säilyy ympäristössä. <i>B. anthracis</i> -itiöt selviytyvät parhaiten kosteassa, lievästi emäksisessä maassa, jossa on runsaasti kalsiumia ja orgaanista ainetta. Pernaruttotaudinpurkauksia on tavattu monenlaisissa ilmastoissa ja sääolosuhteissa, mutta liian alhaiset ja korkeat lämpötilat voivat häiritä <i>B. anthracis</i> -bakteerin sporulaatiota ja germinaatiota. Tulvat voivat lisätä taudinpurkausten määrää nostamalla itiöitä maaperästä laiduntavien eläinten ulottuville. Itiöiden säilymiseen vaikuttavat myös maataloudessa käytettävät lannoitteet ja kemikaalit, maaperän eliöt ja mikrobit sekä kasvillisuus.</p> <p>Viime aikoina tutkimuksissa on saatu viitteitä siitä, ettei <i>B. anthracis</i> ole täysin obligaatisti taudinaiheuttaja, vaan se kykenee elämään myös vegetatiivisena tietynlaisissa mikroympäristöissä isäntäeläimen ulkopuolella. Sekä vegetatiivinen bakteeri että itiö voivat olla monin tavoin vuorovaikutuksessa kasvien ja eläinten kanssa. <i>B. anthracis</i> -itiöt edistävät ruohokasvien kasvua, mikä puolestaan houkuttelee paikalle kasvinsyöjiä ja lisää niiden alttiutta infektiolle. Itiöt pystyvät myös germinoitumaan vegetatiivisiksi bakteereiksi Suomessakin esiintyvän <i>Festuca arundinacea</i> -heinäkasvin eli ruokonatan juuriston tuntumassa. Itiöt voivat säilyä matojen ruuansulatuskanavassa sekä germinoitua ja jakautua ameebassa. Lisäksi <i>B. anthracis</i> voi säilyä vegetatiivisena hyönteisten ruuansulatuskanavassa.</p> <p>Pernaruttoa on esiintynyt eniten Lounais- ja Etelä-Suomessa sekä Pohjanmaan rannikolla. Näiden alueiden maaperässä on runsaasti savikerrostumia. Savimaiden olosuhteet ovat <i>B. anthracis</i> -itiöiden säilymistä suosivia: ne ovat kosteita, emäksisiä ja niiden kalsiumpitoisuus on korkea. Pernaruton säilymistä edistäviä tekijöitä Suomessa voivat olla myös tulvat, viljelysmaan kalkitseminen ja maaperän eliöt. Viileä ilmasto sekä maaperän luontaisesti alhainen pH saattavat puolestaan vähentää taudinpurkauksien määrää.</p> <p>Pernaruttoa tavataan Suomessa enää harvakseltaan, mutta koska itiöt voivat säilyä maaperässä pitkään, taudista on vaikeaa päästä kokonaan eroon.</p>		
Avainsanat - Nyckelord - Keywords Pernarutto, <i>Bacillus anthracis</i> , bakteeri, itiö, säilyminen, maaperä, kartta		
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto		
Työn johtaja ja ohjaajat - Instruktor och ledare - Director and Supervisors Johtaja: Anna-Maija Virtala Ohjaajat: Joanna Koort & Anna-Maija Virtala		

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	1
2. PERNARUTTO	2
3. <i>BACILLUS ANTHRACIS</i>	4
3.1. Virulenssitekijät	4
3.1.1. Toksiinit	4
3.1.2. Kapseli	5
3.1.3. Muut virulenssitekijät	6
3.1.4. Biofilmit	6
3.2. Itiö	7
3.2.1. Rakenne	8
3.2.2. Sporulaatio eli itiöiden muodostaminen	9
3.2.3. Germinaatio: itiöstä vegetatiiviseksi bakteeriksi	10
3.3. <i>Bacillus anthracis</i> -bakteerin elämä isäntäeläimen ulkopuolella	11
3.4. Genotyypin vaikutus <i>B. anthracis</i> -bakteerin levinneisyyteen	12
4. <i>B. ANTHRACIS</i> -BAKTEERIN YMPÄRISTÖSSÄ SÄILYMISEEN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT	14
4.1. pH, kalsiumpitoisuus ja orgaanisen aineen määrä	14
4.2. Kasvillisuus	16
4.3. Maaperän eliöt ja mikrobit	17
4.4. Ilmasto	19
4.5. UV-säteily	23
4.6. Hyönteiset	24
4.7. Haaskaeläimet	25
4.8. Tuotantoeläinten rehu ja laiduntaminen	26
4.9. Maatalous ja kemikaalit	27
4.10. Raatojen hävittäminen ja alueen desinfektio	27
4.11. Taudin vastustaminen ja hoito	28
5. TAUDINPURKAUKSILLE ALTTIIDEN ALUEIDEN TUNNISTAMINEN	30
6. PERNARUTTO SUOMESSA	32

6.1.	Lainsäädäntö ja pernaruton vastustaminen Suomessa	32
6.2.	Tautitapaukset Suomessa	33
6.3.	Pernaruton säilymiseen vaikuttavat tekijät Suomessa	35
6.3.1.	Maaperä.....	35
6.3.2.	Tulvat	38
6.3.3.	Ilmasto.....	39
6.3.4.	Maaperän eliöt	39
6.3.5.	Kasvillisuus.....	39
6.3.6.	Muut tekijät.....	40
7.	POHDINTA	41

1. JOHDANTO

Tämä liseniaatintutkielma on kirjallisuuskatsaus pernaruttoa aiheuttavan *Bacillus anthracis* -bakteerin säilymisestä ympäristössä sekä säilymiseen vaikuttavista tekijöistä. Pernarutto on vastustettava ja vaarallinen eläintauti (MMMa 843/2013, 1 §, 4 §). Taudin leviäminen voi aiheuttaa mittavia taloudellisia tappioita ja uhata myös ihmisten terveyttä.

Liseniaatintutkielman ensimmäisenä tavoitteena on etsiä kirjallisuudesta riskitekijöitä, jotka lisäävät *Bacillus anthracis* -bakteerien ja itiöiden säilymistä maaperässä ja ympäristössä. *B. anthracis* -bakteeria on pitkään pidetty obligaatina patogeenina, joka voi säilyä isäntäeläimen ulkopuolella vain itiömuodossa. Viime vuosina tutkimuksissa on kuitenkin saatu viitteitä siitä, että bakteeri pystyy elämään tietyissä mikroympäristöissä myös isäntäeläimen ulkopuolella. Bakteerin ja itiöiden säilymiseen ympäristössä vaikuttavat muun muassa maaperän pH, kalsiumpitoisuus ja orgaanisen aineksen määrä, maaperän eliöt, kasvillisuus, hyönteiset, ilmasto ja haaskaeläimet. Tutkielmassa pohditaan myös näiden tekijöiden merkitystä Suomessa.

Työn toisena tavoitteena on tehdä kartta, josta käyvät ilmi Suomen pernaruttotapaukset eläimillä vuodesta 1940 alkaen. Tiedon kokoaminen kartaksi on tärkeää, jotta eläinlääkärit olisivat tietoisia aiemmista pernaruttotapauksista alueellaan ja osaisivat tarvittaessa epäillä pernaruttotartuntaa. Kartan tekemisessä on käytetty lähteenä Sirkka-Liisa Kivelän (nyk. Korpenfelt) syventävien opintojen tutkielmaa ”Pernaruton esiintyminen eläimillä Suomessa vuosina 1940–1990” vuodelta 1993. Pernaruttoa on esiintynyt Suomessa kaksi kertaa tämän ajanjakson jälkeen: vuosina 2004 ja 2008 (Evira 2009, THL 2010, Andersson ym. 2011).

Tutkielman kolmantena tavoitteena on vertailla silmämääräisesti karttoja Suomen maaperästä, tulvariskialueista ja pernaruttotaudinpurkauksista sekä pohtia, miksi pernaruttoa on esiintynyt eniten tietyillä alueilla.

2. PERNARUTTO

Pernarutto on vakava, vaarallinen zoonoosi, jonka aiheuttaa *Bacillus anthracis* -bakteeri. Pernaruttoa tavataan kaikkialla maailmassa (WHO 2008). Vastustusohjelmien, rokotteiden ja antibioottien myötä tautitapausten määrä on vähentynyt huomattavasti 1950-luvulta alkaen, mutta eläimillä pernarutto on yhä yleinen Afrikassa, Keski- ja Etelä-Aasiassa, Etelä-Kiinassa, Etelä-Euroopassa sekä osassa Kanadaa ja Yhdysvaltoja (WHO 2008). Käytännössä kaikki nisäkäslajit voivat sairastua pernaruttoon, ja ennen rokotteen keksimistä vuonna 1937 pernarutto oli tärkein kuolemaan johtava tauti naudoilla, lampailla, vuohilla, sioilla ja hevosilla (WHO 2008).

Märehtijät ovat herkkiä pernarutolle, ja ne sairastuvat tavallisesti taudin tappavaan, perakuuttiin muotoon. Märehtijöille tyypillisiä oireita ovat hyytymätön verenvuoto ruumiinaukoista sekä äkkikuolema (WHO 2008). Märehtijöillä pernaruton ensioireisiin voivat kuulua myös kuume, verenvuoto limakalvoilta (WHO 2008), ataksia ja turvotukset (Mongoh ym. 2008). Perakuuttiin tautiin kuolleen märehtijän kuolonkankeus on epätäydellinen (WHO 2008). Naudoilla on tavattu myös epätyypillistä taudinkuvaa esimerkiksi Ruotsissa (Lewerin ym. 2010) ja Suomessa (Andersson ym. 2011). Ruotsissa osalla sairastuneista naudoista oli kuumetta ja hengitystieoireita, mutta niillä ei havaittu verenvuotoa ja niiden kuolonkankeus oli normaali (Lewerin ym. 2010). Suomessa vuonna 2008 sairastuneella sonnilla oli kuumetta, ruokahaluttomuutta ja sen kivespussiin oli kertynyt nestettä (Andersson ym. 2011). On arveltu, että epätyypillinen taudinkuva voisi johtua tavallista alhaisemmasta infektiomäärästä (Lewerin ym. 2010).

Siat eivät ole yhtä herkkiä pernarutolle kuin märehtijät (Redmond ym. 1997). Sioilla pernarutto oireilee tavallisimmin paikallisina turvotuksina nielun ja pään alueilla sekä kaulan imusolmukkeissa (WHO 2008). Sioilla pernaruttoon voi liittyä myös ruuansulatuskanavan oireita, kuten oksentelua, ripulia ja ummetusta (Redmond ym. 1997).

Hevoset ovat suhteellisen herkkiä pernaruttoinfektioille. Niillä tauti ilmenee yleensä turvotuksena rintakehässä, vatsassa, kaulassa ja raajoissa, kun taas suolisto-oireita ja sepsistä tavataan harvemmin (WHO 2008). Koirat ja kissat ovat suhteellisen vastustuskykyisiä pernarutolle (WHO 2008), joskin tautitapauksia on raportoitu (Blackburn ym. 2014c). Koirilla

ja kissoilla pernarutto voi oireilla muun muassa kielen, nielun, vatsan ja suoliston turvotuksena (WHO 2008).

Laiduntaville kasvinsyöjille tyypillisin tapa saada pernaruttotartunta on itiöiden nieleminen (Turner ym. 2014). Laiduntavat eläimet voivat niellä itiöitä kasvillisuuden mukana tai suoraan maaperästä (Turner ym. 2013). Lehtiä syövät eläimet, kuten hirvi, voivat saada tartunnan syömällä hyönteisten kontaminoimia lehtiä (Braack & De Vos 1990). Pernarutto voi tarttua eläimiin myös purevien ja pistävien hyönteisten välityksellä (Blackburn ym. 2014a, Bengis & Frean 2014). Myös itiöiden inhalaatio esimerkiksi pölyn mukana on mahdollinen, joskaan ei kovin tyypillinen tartuntatapa eläimillä (katsauksessa Dragon & Rennie 1995, WHO 2008). Lisäksi pernarutto voi tarttua ihon ja limakalvon haavojen välityksellä (Hahn ym. 2005).

Ihmiseen pernarutto voi tarttua kolmella tavalla. Ihmisen pernaruttotartunnoista 95 % saadaan ihon kautta, kun *B. anthracis* -itiöt pääsevät kudoksiin esimerkiksi haavan välityksellä ja vaurioittavat ihoa (Doganay ym. 2010). Pernarutto voi tarttua myös hengitysteitse (Frazier ym. 2006). Aluksi ilmenee lieviä hengitystieoireita, mutta tauti voi johtaa vakaviin hengitysvaikeuksiin ja edetä systeemiseksi infektioksi (Frazier ym. 2006). Pernarutto voi tarttua myös ruuansulatuskanavan kautta, jos ihminen syö huonosti kypsennettyä, pernaruttoon sairastuneen eläimen lihaa. Tällöin tyypillisiä oireita ovat haavaumat suussa ja ruokatorvessa sekä vatsakipu, ripuli ja oksentelu (Owen ym. 2015). Hengitysteiden ja ruuansulatuskanavan kautta saaduissa tartunnoissa kuolleisuus on korkea (Frazier ym. 2006, Owen ym. 2015).

3. *BACILLUS ANTHRACIS*

Jotta voidaan ymmärtää *Bacillus anthracis* -bakteerin säilymistä ympäristössä, on tunnettava bakteerin ominaisuudet. Bakteerin ja itiön rakenteet sekä se, että bakteeri voi muodostaa biofilmejä, vaikuttavat *B. anthracis* -bakteerin kykyyn säilyä elinkelpoisena maaperässä.

Bacillus-sukuun kuuluva *Bacillus anthracis* -bakteeri on aerobinen, 3–5 µm pitkä gram-positiivinen sauva (Spencer 2003). *B. anthracis* -bakteerin elinkaareen kuuluu kaksi vaihetta: aktiivinen vaihe vegetatiivisena bakteerina ja lepovaihe itiönä. Vegetatiivinen bakteeri pystyy jakautumaan, tuottamaan toksineja ja aiheuttamaan tautia. Itiöiden avulla *B. anthracis* voi säilyä maaperässä kymmeniä tai jopa satoja vuosia (Manchee 1981, De Vos 1990). Itiöt selviytyvät erityisen hyvin kosteassa ja emäksisessä maaperässä, jossa on runsaasti kalsiumia ja orgaanista ainetta (Smith ym. 2000, U.S. EPA 2014, Chen ym. 2016).

Kun itiö pääsee isännän elimistöön, paikalliset immuunijärjestelmän solut aktivoituvat ja fagosytoivat itiöt. Fagosomeissa itiöt germinoituvat aineenvaihdunnaltaan aktiivisiksi vegetatiivisiksi bakteereiksi ja leviävät verenkierron ja imunesteen välityksellä muualle elimistöön (katsauksessa Tonello & Zorretta 2012).

3.1. Virulenssitekijät

B. anthracis -bakteerin tärkeimmät virulenssitekijät ovat kapseli sekä bakteerin tuottamat edeema- ja letaalitoksiinit. *B. anthracis* -bakteerilla on kaksi virulenssiplasmidia, pXO1 ja pXO2, joista ensimmäinen koodaa toksiinien alayksiköitä (Mikesell ym. 1983, Vodkin & Leppla 1983) ja jälkimmäinen kapselin biosynteesiä (Green ym. 1985). pXO1-plasmidin geenien ilmentämistä säätelevät sekä transkriptiotekijä AtxA (anthrax toxin activator) että hiilidioksidi- ja bikarbonaattipitoisuuksien muutokset, jotka tapahtuvat *B. anthracis* -itiön siirtyessä ympäristöstä isäntäeläimeen (Koehler ym. 1994).

3.1.1. Toksiinit

Pernaruttotoksiinit koostuvat isäntäsolun reseptoreihin sitoutuvasta alayksiköstä eli suojaavasta antigeenistä (protective antigen, PA) sekä kahdesta vaihtoehtoisesta entsyymaattisesta alayksiköstä: letaalitekijästä (lethal factor, LF) tai edeematekijästä (edema factor, EF). Näistä

kolmesta polypeptidistä voi muodostua kahta erilaista toksiniä: letaalitoksiinia (PA + LF) ja edeematoksiinia (PA + EF) (katsauksessa Friebe ym. 2016).

Kun bakteerin itiöt ovat päässeet isäntäeläimen elimistöön ja germinoituneet, *B. anthracis* alkaa tuottaa pernaruttotoksiineja (katsauksessa Friebe ym. 2016). Pernaruttoinfektion alkuvaiheessa *B. anthracis* -bakteerin tuottamat toksinit lamauttavat isäntäeläimen immuunijärjestelmän, minkä seurauksena bakteeri voi jakautua ja levitä isäntäeläimen veri- ja imunestekierrossa (katsauksessa Friebe ym. 2016). Pernaruttotoksiinit tunkeutuvat isäntäeläimen soluihin sitoutumalla solukalvolla sijaitseviin TEM8- ja CMG2-reseptoreihin, minkä jälkeen toksinit kuljetetaan soluun endosytoosilla (Bradley ym. 2001, Scobie ym. 2003). Reseptorien fysiologista roolia ei tunneta tarkkaan, mutta niiden arvellaan osallistuvan soluväliaineen homeostaasin ylläpitämiseen (Deuquet ym. 2012).

Infektion edetessä letaali- ja edeematoksiinit hakeutuvat omiin kohdekudoksiinsa: letaalitoksiini sydänlihassoluihin ja sileisiin lihassoluihin, edeematoksiini hepatosyytteihin ja mahdollisesti myös epiteelisoluihin (Liu ym. 2013). Toksiinit vaurioittavat soluja eri tavoin. Letaalitoksiini hajottaa solun elämää ylläpitäviä MEK-proteiineja (mitogeeniaktivoituva proteiinikinaasikinaasi), mikä johtaa solujen apoptoosiin eli ohjelmoituun solukuolemaan (Duesbery ym. 1998), kun taas edeematoksiini muuttaa solunsisäistä adenosiinitrifosfaattia (ATP) syklisteksi adenosiinimonofosfaatiksi (cAMP), mikä aiheuttaa häiriöitä solujen nestetasapainossa (Shen ym. 2002).

3.1.2. Kapseli

B. anthracis -bakteerin kapseli suojaa vegetatiivista bakteeria komplementilta ja estää isäntäeläimen immuunijärjestelmän soluja fagosytoimasta sitä (Makino ym. 1989, Makino ym. 2002), mikä edistää bakteerin leviämistä elimistössä (Candela & Fouet 2006). Kapseli on kiinnittynyt vegetatiivisen bakteerin soluseinään (Candela & Fouet 2005). Kapseli koostuu poly- γ -D-glutamaattihapoista eli lineaarisista polymeereistä, jotka aiheuttavat isäntäeläimessä vain alhaisen immuunivasteen (Goodman & Nitecki 1967). Hapot aikaansaavat kapselin pinnalle negatiivisen sähkövarauksen, joka suojaa bakteeria fagosytoosilta ja komplementilta (Makino ym. 1989, Makino ym. 2002).

Kapseli muodostuu fagosyytin sisällä germinaation aikana (katsauksessa Tonello & Zornetta 2012). Germinaatioissa itiö muuttuu aineenvaihdunnaltaan aktiiviseksi vegetatiiviseksi bakteeriksi (katsauksessa Swick ym. 2016). *In vitro* -tutkimuksissa on havaittu, että kapselia

ilmennetään etenkin kohonneissa hiilidioksidi- ja bikarbonaattipitoisuuksissa, mikä vastaa fagosomin olosuhteita (Makino ym. 1989, Koehler ym. 1994).

Kapseli estää neutrofiilien erittämien bakteriosidisten eli bakteereja tappavien aineiden pääsyä bakteerisoluun (Keppie ym. 1963). Kapselilla on tärkeä rooli myös *B. anthracis* -bakteerin kiinnittymisessä verisuonten seinämän endoteelisoluihin etenkin maksassa (Piris-Gimenez ym. 2009). Lisäksi bakteeri pystyy hajottamaan CapD-depolymeraasilla kapseliaan, jonka hajoamistuotteet toimivat virulenssitekijöinä (Makino ym. 2002). Kapseli pystyy myös heikentämään immuunijärjestelmän dendriittisolujen toimintaa (Jelacic ym. 2014).

3.1.3. Muut virulenssitekijät

Vaikka toksiinit ja kapseli ovat *B. anthracis* -bakteerin keskeisimmät virulenssitekijät, bakteerilta on löydetty myös muita taudinaiheuttamiskykyä lisääviä mekanismeja. Bakteeri erittää runsaasti antigeenisia proteiineja (Ariel ym. 2002). Esimerkiksi HtrA-proteiinia koodaavan geenin saattaminen toimintakyvyttömäksi heikentää *B. anthracis* -bakteerin vastustuskykyä korkeille lämpötiloille, etanolille sekä oksidatiiviselle ja osmoottiselle stressille (Chitlaru ym. 2011). Mangaania sitova MntA-lipoproteiini vaikuttaa *B. anthracis* -bakteerin kasvuun, oksidatiivisen stressin sietokykyyn ja vapautumiseen makrofageista (Gat ym. 2005). Lisäksi *B. anthracis* tarvitsee sideroforeja eli rautaa sitovia molekyylejä kasvuun makrofageissa (Cendrowski ym. 2004).

B. anthracis pystyy myös tuottamaan nitriittioksidia, yhdistettä, jota fagosyytit tavallisesti käyttävät bakteereja vastaan. Nitriittioksidilla *B. anthracis* pystyy puolustautumaan makrofagien aiheuttamalta oksidatiiviselta stressiltä (Shatalin ym. 2008).

3.1.4. Biofilmit

Tutkimuksissa on saatu viitteitä siitä, että *B. anthracis* kykenee säilymään isäntäeläimen ulkopuolella vegetatiivisena muodostamalla biofilmejä (Lee ym. 2007, Schuch & Fischetti 2009). Aiemmin on osoitettu, että monet muut *B. anthracis* -bakteerille läheistä sukua olevat *Bacillus*-suvun bakteerit, kuten *B. subtilis* ja *B. cereus*, pystyvät muodostamaan biofilmejä (Ren ym. 2004, Rasko ym. 2005).

Biofilmit ovat mikrobien muodostamia yhteisöjä, jotka tuottavat ympärilleen proteiineista, polysakkarideista ja entsyymeistä koostuvaa ekstrasellulaarista polymeeristä materiaalia (EPS)

(katsauksessa Costerton ym. 1999). Biofilmejä muodostavat bakteerit ovat kiinnittyneitä sekä toisiinsa että alustaansa (katsauksessa Costerton ym. 1999). Biofilmit ovat vapaana kasvavia eli planktonisia bakteerisoluja vastustuskykyisempiä muun muassa kuivuudelle, kemikaaleille, mikrobilääkkeille ja isäntäeläimen immuunijärjestelmän soluille (Lee ym. 2007). *B. anthracis* -biofilmit olivat Leen ym. (2007) tutkimuksessa resistenttejä siprofloksasiinille ja doksisykliinille jo kahdeksan tunnin kuluttua lasilevyn pintaan kiinnittymisen jälkeen. Tutkimuksessa havaittiin, että seitsemän vuorokauden kuluttua kiinnittymisestä biofilmit olivat resistenttejä jopa 10 %:n vahvuiselle valkaisuaineelle (Lee ym. 2007).

B. anthracis -bakteerin kyky muodostaa biofilmejä voikin edesauttaa vegetatiivisen bakteerin säilymistä isäntäeläimen ulkopuolella. Bakteerit muodostavat biofilmejä tyypillisesti silloin, kun niillä on puutetta ravinteista (katsauksessa Costerton ym. 1999). Toisaalta ravinteiden vähäisyys edistää myös vegetatiivisten *B. anthracis* -bakteerien sporulaatiota eli itiöiden muodostamista (Brunsing ym. 2005). Onkin esitetty, että biofilmit voisivat rakenteensa vuoksi luoda vegetatiivisille *B. anthracis* -bakteereille sopivan mikroympäristön, jonka sisällä bakteerit selviävät heikoissakin ympäristöolosuhteissa (Lee ym. 2007). Kun biofilmin hiilidioksidipitoisuus soluviljelmässä kasvaa, vegetatiivisten solujen osuus kasvaa verrattuna tavallisiin ympäristöolosuhteisiin (Lee ym. 2007).

3.2. Itiö

Bacillus anthracis -bakteeri pystyy muodostamaan itiöitä eli sporuloitumaan, kun ympäristön olosuhteet muuttuvat vegetatiivisen bakteerin kannalta epäsuotuisiksi. Itiöiden muodostaminen mahdollistaa sen, että *B. anthracis* selviää ja säilyttää elinkykynsä monenlaisissa olosuhteissa, kuten maaperässä, vesialueilla sekä isäntäeläimen elimistössä (Nicholson 2002). Itiöt ovat aineenvaihdunnaltaan lepotilassa, mutta silti vuorovaikutuksessa ympäristönsä kanssa: ne pystyvät aistimaan ympäristön muutoksia, kuten hiilidioksidipitoisuutta ja ravinteiden määrää (katsauksessa Driks 2009). Kun olosuhteet muuttuvat bakteerin kasvulle suotuisiksi, itiö germinoituu nopeasti vegetatiiviseksi bakteeriksi. *B. anthracis* -itiöt voivat säilyä maaperässä pitkään, vastustaa isäntäeläimen immuunijärjestelmää ja aiheuttaa pernaruttoa saavuttaessaan oikean sijainnin isäntäeläimen elimistössä (katsauksessa Driks 2009).

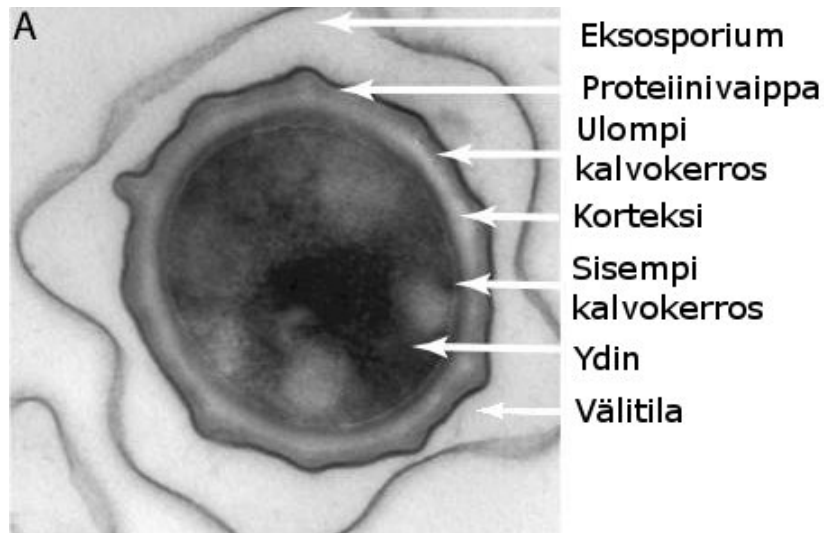
3.2.1. Rakenne

B. anthracis -itiö on rakenteeltaan samankaltainen kuin muillakin *Bacillus*-suvun bakteerien itiöillä eksosporiumia eli itiövaippaa sekä proteiinivaippaa lukuun ottamatta (Kuva 1, Liu ym. 2004). Itiö koostuu useasta kerroksesta, joista jokainen vaikuttaa itiön elinkykyyn ja pitkäaikaiseen säilymiseen maaperässä (katsauksessa Driks 2009).

Itiön keskellä on ydin, jossa sijaitsee bakteerin DNA pakkautuneena kromosomiin. DNA on sitoutunut pieniin, happoliukoisiin proteiineihin (small acid-soluble proteins, SASP) (katsauksessa Driks 2009). Itiön ytimessä on myös runsaasti dipikoliinihappoja, joihin on kiinnittynyt metalli-ioneja, kuten kalsiumia. Dipikoliinihappo suojaa yhdessä SASP-proteiinien kanssa itiötä haitallisilta ympäristötekijöiltä, kuten kuumuudelta ja UV-säteilyltä (katsauksessa Driks 2009). Dipikoliinihappo suojaa ytimen proteiineja myös kosteudelta – germinaation alkuvaiheessa ytimestä menetetään dipikoliinihappoja, minkä seurauksena itiöön pääsee vettä (Setlow B ym. 2006). Kalsium ja dipikoliinihappo muodostavat ristikkomaisen rakenteen, joka tasapainottaa ytimen DNA:ta ja entsyymejä sekä lisää itiön kestävyyttä äärimmäisiä lämpötiloja kohtaan (Foerster & Foster 1966). *Bacillus*-suvun itiöiden ytimen pH on noin 6,5 eli noin 1–1,5 yksikköä alhaisempi kuin vegetatiivisilla *Bacillus*-bakteereilla (Setlow B & Setlow P 1980).

Itiön ydintä ympäröivät kalvokerros sekä peptidoglykaaneista koostuva korteksi, jotka estävät osaltaan kosteuden pääsyä itiön ytimeen (Setlow 2003). Korteksia peittää ohut, monikerroksinen proteiinivaippa (Driks 2002), joka estää hajottavien molekyylien ja toksiinien pääsyn ytimeen (Laaberki & Dworkin 2008).

Itiön uloin rakenne on eksosporium eli itiövaippa (katsauksessa Driks 2009). Itiövaipan (eksosporium) ja proteiinivaipan välissä on välitila. On esitetty, että välitilassa olisi proteiineja, jotka vaikuttavat itiövaipan rakenteeseen (Giorno ym. 2009). Itiövaippa muodostuu tyvikalvosta ja siihen kiinnittyneistä kollageenin kaltaisista glykoproteiineista (Sylvestre ym. 2002). Glykoproteiinit BclA ja BclB muodostavat itiövaippaan nukkamaisen pinnan, joka luo negatiivisen sähkövarauksen itiön pinnalle (Sylvestre ym. 2003, Chen ym. 2010). Varauksen ansiosta itiöt pystyvät emäksisissä olosuhteissa kiinnittymään maaperän humukseen ja kalkkikiveen (Chen ym. 2010).



Kuva 1. *Bacillus anthracis* -itiön rakenne (Liu ym. 2004, uudelleenjulkaistu kustantajan luvalla).

Vaikka itiövaippa on tärkeä rakenne *B. anthracis* -itiön selviytymisen kannalta, se ei kuitenkaan itsessään aiheuta pernaruttoa tai taudin oireita (Bozue ym. 2007a, Bozue ym. 2007b). Itiöt, joilta on poistettu BclA-glykoproteiinia koodaava geeni, aiheuttavat hiirissä ja marsuissa pernaruttoa siinä missä villityypin itiötkin (Bozue ym. 2007a). Bozue ym. (2007b) havaitsivat, että *B. anthracis* -itiö, jolta puuttuu BclA-glykoproteiini, kiinnittyy paremmin epiteelisoluihin, fibroblasteihin ja endoteelisoluihin kuin villityypin itiö. Itiöiden kiinnittymisessä makrofageihin ei kuitenkaan ollut eroa. Tämä saattaa viitata siihen, että BclA ohjaa itiöiden kiinnittymistä makrofageihin, joiden avulla *B. anthracis* leviää isäntäeläimen elimistössä, ja estää bakteeria kiinnittymästä infektion alkuvaiheen kannalta epäolennaisiin soluihin (Bozue ym. 2007b).

3.2.2. Sporulaatio eli itiöiden muodostaminen

Sporulaatio eli itiöiden muodostaminen on monimutkainen ja suhteellisen hidas tapahtumaketju, joka voi kestää olosuhteista riippuen 4–8 tunnista vuorokausiin (Lindeque & Turnbull 1994, katsauksessa Driks 2009). Vielä ei ole täysin selvää, mitkä sporulaation laukaisevat mekanismit tarkalleen ovat (katsauksessa Swick ym. 2016). Tiedetään kuitenkin, että ravinteiden sekä muiden kasvua edistävien molekyylien puute stimuloi sporulaatiota (katsauksessa Swick ym. 2016). *B. anthracis* -itiössä on sensorikinaaseja, jotka havaitsevat ympäristön muutoksia ja aktivoivat itiöitymiseen liittyvän fosforylaatiokaskadin, kun

olosuhteet ovat vegetatiivisen bakteerin elämälle epäsuotuisat (Brunsing ym. 2005). Sensorikinaasit aistivat ympäristöä myös infektion aikana, kun *B. anthracis* on isäntäeläimessä: tuolloin bakteerin ei kannata sporuloitua, vaan jakautua ja tuottaa mahdollisimman paljon toksiineja (White ym. 2006).

Sporulaation aikana *B. anthracis* sitoo ympäristöstä metalli-ioneja, joista tärkein on kalsium (Foerster & Foster 1966). Sporulaatiossa jokainen vegetatiivinen bakteeri muodostaa yhden itiön ja vapauttaa sen ympäristöön hajotessaan (katsauksessa Dragon & Rennie 1995). Sporulaation onnistuminen ja kesto riippuvat ympäristön olosuhteista, kuten lämpötilasta. Epäsuotuisissa olosuhteissa sporulaatio voi estyä kokonaan, jolloin vegetatiiviset bakteerisolut kuolevat (Howie 1949).

3.2.3. Germinaatio: itiöstä vegetatiiviseksi bakteeriksi

Germinaatiossa aineenvaihdunnaltaan inaktiiviset itiöt muuttuvat vegetatiivisiksi bakteereiksi (katsauksessa Swick ym. 2016). Itiöt aistivat ympäristöstään germinantteja eli molekyylejä ja signaaleja, jotka stimuloivat germinaatiota esimerkiksi silloin, kun itiö pääsee isännän elimistöön (katsauksessa Swick ym. 2016). *B. anthracis* -itiölle tärkeimpiä germinantteja ovat alaniini- ja puriiniribonukleotidit sekä tietyt aminohapot. *B. anthracis* tarvitsee vähintään kahta eri germinanttia muuttuakseen jälleen vegetatiivisiksi bakteereiksi. Mitä enemmän germinantteja on läsnä määrällisesti, sitä vähemmän itiö tarvitsee erilaisia germinantteja germinaation alkamiseen (katsauksessa Swick ym. 2016). *B. anthracis* -bakteerilla on kuvattu useita erilaista germinaatioreittejä, joissa tarvitaan erilaisia aminohappojen, hiilihydraattien ja ionien yhdistelmiä germinaation indusoimiseksi (Ireland & Hanna 2002, Weiner & Hanna 2003, Fisher & Hanna 2005, Yi & Setlow 2010).

Bacillus-suvun itiöistä on löydetty germinanttireseptoreita, joihin germinanttien arvellaan sitoutuvan (Christie ym. 2010, Mongkolthanaruk ym. 2011). Germinantin sitoutuminen reseptoriin aloittaa germinaatiokaskadin. Kaskadi alkaa siten, että itiöstä vapautuu H^+ -ioneja, yhdenarvoisia kationeja sekä Zn^{2+} -ioneja (Jedrzejewski & Setlow 2001). H^+ -ionien vapautuminen nostaa itiön ytimen pH:n noin 6,5:stä 7,7:ään (Jedrzejewski & Setlow 2001). Itiöstä alkaa myös vapautua dipikoliinihappoa, jolloin sen sisään virtaa vettä (katsauksessa Swick ym. 2016). Itiön ydin turpoaa ja korteksia hajottavat entsyymit hajottavat korteksin peptidoglykaanin (katsauksessa Driks 2009). Veden lisääntynyt määrä sekä pH:n muutos itiön ytimessä

palauttavat bakteerin entsyymitoiminnan aktiiviseksi (Jedrzejewski & Setlow 2001). Myös itiön rakenteiden vaurioituminen voi käynnistää germinaation (katsauksessa Swick ym. 2016).

Williams ym. (2013) tutkivat itiövaipan merkitystä pernaruttoitiön jakautumisessa ympäristöön ja havaitsivat, että itiövaipan poistaminen vähensi itiön hydrofobisuutta (Williams ym. 2013). Itiöt, joilla oli itiövaippa, kiinnittyivät runsaasti kalsiumia ja orgaanista ainetta sisältävään maa-aineeseen paremmin kuin vähäravinteiseen maa-aineeseen (Williams ym. 2013). Tämä viittaa siihen, että itiövaipalla on keskeinen merkitys itiön kiinnittymisessä maaperään.

3.3. *Bacillus anthracis* -bakteerin elämä isäntäeläimen ulkopuolella

Bacillus anthracis -bakteerin elämänsykli isäntäeläimen ulkopuolella on monimutkainen ja myös kiistanalainen asia. Bakteeria on pitkään pidetty obligaatina patogeenina, joka ei kykene elämään vegetatiivisena isännän ulkopuolella. Viime vuosina tutkimuksissa on kuitenkin saatu viitteitä siitä, ettei *B. anthracis* -bakteerin elämänsykli rajoitu ainoastaan isäntäeläimeen.

B. anthracis pystyy laboratorio-olosuhteissa elämään vegetatiivisena heinäkasvin ritsosfäärissä eli juurien tuntumassa (Saile & Koehler 2006). *B. anthracis* kykenee myös germinoitumaan ja jakaantumaan yleisessä maaperässä elävässä *Acanthamoeba castellanii* -ameebassa (Dey ym. 2012). Bakteriofagin infektoimat *B. anthracis* -bakteerit pystyivät asuttamaan *Eisenia fetida* -sukkulamadon ruuansulatuskanavan (Schuch & Fischetti 2009). Lisäksi *B. anthracis* voi säilyä muutamia päiviä vegetatiivisena karpäsen ruuansulatuskanavassa (Terzi ym. 2014).

Germinatio ja jakautuminen isännän ulkopuolella johtaisivat siihen, että bakteerin määrä ympäristössä moninkertaistuisi. On kuitenkin havaittu, että jakautuminen isäntäeläimen ulkopuolella voi heikentää *B. anthracis* -bakteerin virulenssia (katsauksessa Dragon & Rennie 1995). Kapselia koodaava virulenssiplasmidi pXO2 on epästabiili bakteerin jakautumisen aikana, ja *B. anthracis* voikin menettää plasmidin germinoituaan isännän ulkopuolella, kun uudessa elinympäristössä ei ole valintapainetta kapselin fagocytoosia estäville ominaisuuksille (Green ym. 1985).

Braun ym. (2015) ovat esittäneet, että plasmidin menettäminen on merkki siitä, että *B. anthracis* -bakteerilla saattaa olla maaperässäkin jonkinasteista metaboliaa. Braun ym. (2015) eristivät *B. anthracis* -bakteeria maaperästä, johon oli haudattu pernaruttoon kuollut eläin, ja havaitsivat, että yksi isolaateista oli menettänyt pXO1-virulenssiplasmidinsa. Vastaavaa kantaa ei ollut havaittu tutkitussa infektiossa, joten plasmidin menetyksen oli täytynyt tapahtua maaperässä (Braun ym. 2015).

Laboratoriotutkimuksiin vegetatiivisen *B. anthracis* -bakteerin selviytymisestä erilaisissa ympäristöissä on kuitenkin suhtauduttava varauksella. Vaikka olosuhteet maaperässä olisivatkin otolliset germinaatiolle ja bakteerien kasvulle, vegetatiiviset *B. anthracis* -bakteerit ovat herkkiä kilpailulle maaperän muiden bakteerien ja eliöiden kanssa (katsauksessa Dragon & Rennie 1995).

Bacillus anthracis -bakteerin eristämisessä myös oikeat näytteenottomenetelmät ovat tärkeitä. Itiöitä voi olla vaikeaa löytää maaperästä muun muassa niiden alhaisen konsentraation ja maaperän bakteerikasvua estävien yhdisteiden takia. Näytteenoton vaikeus voikin olla yksi syy siihen, miksi kenttätutkimuksissa on saatu ristiriitaisia tuloksia itiöiden säilymisestä maaperässä – toisaalta todennäköisesti vain pieni osa ympäristöön vapautuneista bakteereista sporuloi onnistuneesti (Lindeque & Turnbull 1994). Itiöiden havaitsemiseksi puhtaista, pelkkiä itiöitä sisältävistä näytteistä on kehitetty monenlaisia metodeja, kuten esimerkiksi biokemiallisia, geneettisiä ja immunologisia analyysejä (Rao ym. 2010). Luotettavalle ja arvioidulle menetelmälle, jolla itiöt voidaan erottaa, konsentroida ja puhdistaa maaperästä nopeasti ja edullisesti olisi kuitenkin tarvetta (Rao ym. 2010).

3.4. Genotyypin vaikutus *B. anthracis* -bakteerin levinneisyyteen

Bacillus anthracis kuuluu *Bacillus cereus sensu lato* -ryhmään, johon kuuluvat myös *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pseudomycoides* ja *Bacillus weihenstephanensis* (Zwick ym. 2012). *B. cereus* on maaperän saprofyutti, suoliston kommensaali ja opportunisti taudinaiheuttaja. Myös *B. mycoides* on maaperän saprofyutti, ja *B. thuringiensis* on hyönteisille tautia aiheuttava bakteeri (Schuch & Fischetti 2009). *Bacillus*-sukuun kuuluu yli sata bakteeria, mutta vain *B. cereus sensu lato* -ryhmään kuuluvat bakteerit on yhdistetty nisäkkäiden obliigateihin infektioihin (Zwick ym. 2012).

Bacillus-suvun bakteerit ovat geneettisesti läheistä sukua toisilleen ja niiden välillä esiintyy vain vähän geneettistä monimuotoisuutta (Daffonchio ym. 2003, Priest ym. 2004, Rasko ym. 2005). Plasmidit ovat *Bacillus cereus sensu lato* -ryhmällä yleisiä (Rasko ym. 2005). Bakteereiden plasmidien välillä esiintyy geneettistä vaihtelua, mikä viittaa siihen, että bakteerit kykenevät horisontaaliseen geeninsiirtoon (Zwick ym. 2012). Erot bakteerien elämäntyyeissä selittyvät osin plasmideilla (Rasko ym. 2005). *B. anthracis* -bakteerin kromosomissa on myös neljä profaagia (Sozhamannan ym. 2006). Profaagien sisältöä ei vielä tiedetä, mutta *B.*

cereus -ryhmän bakteereista ne on löydetty ainoastaan *B. anthracis* -bakteerilta (Sozhamannan ym. 2006).

Maaperästä eristetyistä *B. anthracis* -bakteereista on löydetty geneettistä muuntelua analysoimalla yhden emäksen polymorfismeja (SNP). *B. anthracis* voidaan jakaa A-, B- ja C-linjoin, jotka jakautuvat edelleen kahteentoista alaluokkaan ja yhä useampiin genotyypeihin (Van Ert ym. 2007). Bakterin A-linja on leviittänyt ympäri maailmaa (Van Ert ym. 2007), ja sillä on havaittu olevan enemmän geneettistä monimuotoisuutta kuin B-linjalla (Smith ym. 2000). Kazakhstanissa tehdyissä genotyyppityksissä on havaittu, että *B. anthracis* -bakteerin A1.a alalinja jakautuu ympäristössä laajemmin kuin muut A-linjan isolaatit (Mullins ym. 2011). A1.a on yleisin *Bacillus anthracis* -linja Yhdysvalloissa, Italiassa ja Kazakhstanissa (Mullins ym. 2013). B- ja C-linjan bakteerit ovat harvinaisempia ja niitä esiintyy vain tietyillä alueilla (Van Ert ym. 2007). B-linjaa tavataan lähinnä Etelä-Afrikassa, Itä-Euroopassa ja Ranskassa. C-linja on kaikkein harvinaisin – vain kaksi Van Ertin ym. (2007) tutkimuksessa analysoidusta yli tuhannesta isolaatista kuului C-linjaan. Mikäli linjojen levinneisyyttä ja isolaattien määrää pidetään selviytymiskyvyn mittarina, ovat harvinaisemmat B- ja C-linjat selviytymiskyvyltään heikompia kuin A-linja (Van Ert ym. 2007).

Toisaalta myös ihmisen toimet ovat vaikuttaneet *B. anthracis* -genotyyppien jakautumiseen (Van Ert ym. 2007). Krugerin kansallispuistosta eristettyjen *B. anthracis* -kantojen geneettiset eroavaisuudet ovat johtaneet hypoteesiin siitä, että Afrikan eteläosat saattaisivat olla *B. anthracis* -bakteerin maantieteellinen alkuperä (Smith ym. 2000). Van Ertin ym. (2007) mukaan bakterin A-linja levisi ensimmäisen kerran noin 3300–6600 vuotta sitten, kun ihmiset alkoivat asuttaa maapalloa laajemmin ja kotieläinten pito yleistyi. On myös viitteitä siitä, että bakteeri olisi kulkeutunut siirtomaa-ajan kauppaliikenteen mukana Euroopasta Pohjois-Amerikkaan. *B. anthracis* -itiöiden kontaminoimia eläinperäisiä tuotteita tuodaan nykyäänkin kehitysmaista teollisuusmaihin (Van Ert ym. 2007).

B. anthracis -bakteerin geneettinen erikoistuminen erilaisiin maaperiin ja maantieteellisille alueille onkin tuonut esille tarpeen mallintaa bakterin ekologisia lokeroita (Mullins ym. 2013). Mallintamisen avulla voidaan ymmärtää paremmin bakterin jakautumista ja jopa ennustaa, mitkä alueet ovat alttiita taudinpurkauksille (Blackburn ym. 2007). Mallintamista käsitellään tarkemmin luvussa 5.

4. B. ANTHRACIS -BAKTEERIN YMPÄRISTÖSSÄ SÄILYMISEEN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT

Van Ness (1971) arveli jo 1970-luvulla, että *Bacillus anthracis* -bakteerilla voisi olla ympäristössä inkubaatioalueita, joissa se voisi jatkaa elämänkiertoaan vegetatiivisesta bakteerista itiöksi ja takaisin isäntäeläimen ulkopuolella. Van Ness perusti havaintonsa toistuviin nautakarjan pernaruttotaudinpurkauksiin Pohjois-Amerikassa. Hän ehdotti, että inkubaatioalueita voisivat olla maaperät, joissa on runsaasti kalsiumia ja orgaanista ainetta ja joiden pH vähintään 6,0. Lisäksi ympäristön lämpötilan tulisi olla vähintään 15,5 °C. Germinaatiolle ja bakteerien kasvulle suotuisia inkubaatioalueita syntyy sateiden yhteydessä, kun kasvillisuutta, kalsiumia ja maaperän suoloja kertyy sateen mukana syvänteisiin (Van Ness 1971). Van Nessin teoriaa inkubaatioalueista on pidetty epäuskottavana, mutta viime aikoina monissa tutkimuksissa on saatu viitteitä siitä, että *B. anthracis* -bakteerilla voi olla elämää myös isäntäeläimen ulkopuolisissa mikroympäristöissä.

Itiöillä on keskeinen merkitys *B. anthracis* -bakteerin säilymisen kannalta. Ne voivat sietää kuivuutta, äärimmäisiä lämpötiloja, pH:n vaihtelua ja ultraviolettisäteilyä pitkiä aikoja. Itiöiden säilymiseen maaperässä vaikuttavat myös maaperän ominaisuudet, ilmasto, maasto sekä alueen kasvillisuus, hyönteiset ja eläimet. Itiöt voivat säilyä maaperässä pitkään. Esimerkiksi Skotlannissa sijaitsevalle Gruinard Island -saarelle vapautettiin toisen maailmansodan aikana *B. anthracis* -itiöitä, joiden havaittiin olevan elinkelpoisia vielä 40 vuoden kuluttua (Manchee ym. 1981). Krugerin kansallispuistosta, Etelä-Afrikasta, löytyneistä 200 vuotta vanhoista luista on pystytty eristämään pernaruttoa (De Vos 1990).

4.1. pH, kalsiumpitoisuus ja orgaanisen aineen määrä

Maaperän kalsiumpitoisuudella ja pH:lla ajatellaan olevan keskeinen merkitys *B. anthracis* -itiön säilymisessä elinvoimaisena maaperässä (katsauksessa Dragon & Rennie 1995). *B. anthracis* näyttäisi selviävän parhaiten lievästi emäksisessä maaperässä. Krugerin kansallispuistossa, Etelä-Afrikassa, tehty tutkimus osoitti, että kun maaperän kalsiumpitoisuus oli yli 150 me/kg ja pH yli 7, pernaruttoon kuolleiden sorkka- ja kavioläimien määrä seitsenkertaistui lähialueiden toisenlaisiin maaperiin verrattuna (Smith ym. 2000). Kiinassa ihmisen pernaruttoinfektioita tavattiin eniten alueilla, joilla maaperän pH oli yli 6,1 (Chen ym. 2016), mikä vastaa suurin piirtein Van Nessin (1971) arviota inkubaatioalueen vähimmäis-pH:sta. Serengetin kansallispuistossa Tansaniassa havaittiin, että koirilla oli eniten vasta-aineita

B. anthracis -bakteerille alueella, jossa maaperä oli emäksinen, ja myös afrikanpuhvelien ja leijonien vasta-ainestatus korreloi maaperän emäksisyyden kanssa (Hampson ym. 2011).

Vaikka *B. anthracis* suosiikin lievästi emäksistä maaperää, itiöt voivat selvitä myös hyvin happamissa olosuhteissa. Itiöiden on osoitettu kulkeutuvan vahingoittumattomina lintujen ja monien yksimahaisten nisäkkäiden ruuansulatuskanavan läpi, vaikka mahanesteen pH voi olla hyvin alhainen (Houston & Cooper 1975, Lindeque & Turnbull 1994). Elinkykyisiä itiöitä havaittiin esimerkiksi korppikotkan ulosteessa, vaikka korppikotkan mahanesteen pH on noin 1–2 (Houston & Cooper 1975).

B. anthracis -bakteerin eri genotyypit eroavat toisistaan sen suhteen, miten hyvin ne selviävät erilaisissa maaperissä. On havaittu, että A-linjaan kuuluvat itiöt sietävät matalampaa pH:ta ja alhaisempaa kalsiumpitoisuutta kuin B-linjan itiöt (Smith ym. 2000). A-linjaa havaittiin maaperässä, jonka pH oli keskimäärin 6,74 ja kalsiumpitoisuus 186 me/kg, kun taas B-linjaa havaittiin maaperässä, jonka pH oli keskimäärin 7,76 ja kalsiumpitoisuus 274 me/kg (Smith ym. 2000).

B. anthracis -itiön pinta on varaukseltaan negatiivinen (Chen ym. 2010). Emäksisessä maaperässä negatiivisesti varautuneet itiöt vetävät puoleensa positiivisesti varautuneita kalsium- sekä muita kahdenarvoisia kationeja. Toisaalta maaperässä, jonka kalsiumpitoisuus on korkea, itiön sisältämän kalsiumin vuotaminen ympäröivään maaperään vähenee, mikä auttaa itiötä säilymään elinkykyisenä maaperässä (Himsworth 2008, White ym. 2012). Maaperän pH:n lasku voi sen sijaan horjuttaa tasapainoa ja saada kahdenarvoiset kationit vuotamaan ulos itiöstä, mikä heikentää itiön elinkykyä (White ym. 2012). Noin 95 % *B. anthracis* -itiön sisältämästä kalsiumista on varastoitunut ytimeen ja noin 5 % itiövaippaan (Himsworth 2008).

Sporulaation aikana *B. anthracis* voi sitoa kalsiumia tai muita metalli-ioneja ympäröivästä maaperästä. Asiaa on tutkittu *B. anthracis* -bakteerille läheistä sukua olevilla *B. megantherium*- ja *B. cereus* -bakteereilla. Kun *B. megantherium* ja *B. cereus* -bakteereiden itiöitä pidettiin kahdessa eri liuoksessa, joissa oli saman verran joko kalsium- ja barium-ioneja tai kalsium- ja strontiumioneja, itiöihin kertyi kaikkia metalleja lähes saman verran (Foerster & Foster 1966). Itiöt, joiden ulottuvilla oli kalsiumia, germinoituivat nopeammin kuin itiöt, joilla oli vain strontiumia tai bariumia käytettävissään (Foerster & Foster 1966). Vaikka strontium- ja bariumitiöt sietivät kuumuutta hyvin, kalsiumia sisältävät itiöt kestivät korkeita lämpötiloja pisimpään: niistä vain noin 5 % tuhoutui 65 °C:ssa ja noin 25 % 75 °C:ssa 80 minuutin kuluessa.

Itiön ytimessä sijaitsevaa dipikoliinihappoa vapautui kuumennettaessa enemmän ja nopeammin barium- ja strontiumitiöistä kuin kalsiumitiöistä (Foerster & Foster 1966).

B. anthracis -itiöiden selviäminen maaperässä korreloi myös orgaanisen aineksen määrän kanssa. Sähkövaraukseltaan negatiivinen itiövaippa pystyy emäksisissä olosuhteissa sitoutumaan positiivisesti varautuneeseen maa-ainekseen, kuten humukseen ja kalkkikiveen (Chen 2010, Williams ym. 2013). Kiinassa pernaruttoa esiintyy enemmän alueilla, joissa maaperän orgaanisen hiilen pitoisuus on korkea (Chen ym. 2016). Myös Kazakstanissa pernaruttotapaukset keskittyvät alueille, joissa maaperässä on runsaasti orgaanista ainetta, kun taas maan keskiosassa, joka on aavikoitunut ja maaperältään köyhä, tautia tavataan harvoin (Aikembayev ym. 2010).

4.2. Kasvillisuus

Saile ja Koehler (2006) havaitsivat, että *B. anthracis* pystyy elämään vegetatiivisena heinäkasvin (*Festuca arundinacea*) ritsosfäärissä eli kasvin juuriston välittömässä vaikutuspiirissä olevassa maaperässä. Tutkimuksessa kasvin ritsosfääriin lisättiin *B. anthracis* -itiöitä, joista 47 % germinoitui 2–4 vuorokauden kuluessa. Maaperässä, jossa ei ollut kasvia, itiöt eivät germinoineet lainkaan.

Saile ja Koehler (2006) havaitsivat myös, että eri *B. anthracis* -kantojen välillä tapahtui plasmidin siirtoa. Tämä viittaa heidän mukaansa siihen, että bakteerisolut voisivat olla maaperässä metabolisesti aktiivisia. He esittävätkin, että *B. anthracis* voisi muiden *Bacillus*-suvun bakteerien tavoin elää isäntäeläimen ulkopuolella saprofyytinä eli kuolleella orgaanisella aineella elävänä organismina. *B. anthracis* -bakteerin säilymiseen maaperässä vaikuttavat kuitenkin myös ravinteiden määrä ja kilpailu muiden bakteerin kanssa. Saile ja Koehlerin tutkimus on kuitenkin tärkeä osoitus siitä, että *B. anthracis* voi olla metabolisesti aktiivinen myös isäntäeläimen ulkopuolella.

Monet *Bacillus*-lajin bakteerit, kuten *B. subtilis* ja *B. thuringiensis*, ovat kasvien kasvua edistäviä (Bai ym. 2003, Barea ym. 2005). Tällaiset bakteerit voivat muun muassa helpottaa ravinteidenottoa ja kuljetusta juuriin (Glick 1995, Lucy ym. 2004), lisätä kasvin vastustuskykyä ja suojata sitä taudinaiheuttajilta sekä hyönteisiltä (van Loon & Glick 2004). Bakteerit voivat myös parantaa kasvin kykyä sietää kuivuutta (Vardharajula ym. 2011).

Ganz ym. (2014) havaitsivat, että myös *B. anthracis* edistää *Enneapogon desvauxii* -ruohokasvin kasvua pernaruttoon kuolleiden eläinten raatojen lähellä ja täten kasvattaa alueella

laiduntavien eläinten tartuntariskiä. Maaperän *B. anthracis* lisäsi *E. desvauxii* -taimien kasvua 50 %, ja bakteeria sisältävälle verelle altistuneista ruohonsiemenistä kasvoi 45 % korkeampaa ruohoa kuin kontrolliryhmässä. Itiöt ja veri yhdessä edesauttoivat *E. desvauxii* -kasvin kasvua eniten, mutta myös pelkät itiöt lisäsivät kasvua (Ganz ym. 2014).

Ganz ym. (2014) eivät kuitenkaan löytäneet viitteitä siitä, että ruohokasvin läsnäolo ja kuolleesta eläimestä vuotanut veri edesauttaisivat *B. anthracis* -bakteerin selviytymistä tai jakautumista maaperässä. *B. anthracis* -bakteeria ei myöskään löytynyt *E. desvauxii* -kasvin lehdistä (Ganz ym. 2014). Turner ym. (2014) sen sijaan löysivät *B. anthracis* -itiöitä ruohonkorsista alueella, jolla seepra oli kuollut pernaruttoon. Itiöitä voitiin eristää ruohonkorsista vielä vuoden kuluttua eläimen kuolemasta, ja ruohonjuurista ja maaperästä itiöitä löytyi vielä kolmen vuoden kuluttua.

Pernaruttoon kuolleen eläimen raato muuttaa paikallisesti maaperän ravinnepitoisuuksia (Turner ym. 2014). Raato nostaa maaperän fosfori- ja typpipitoisuutta sekä pH:ta ainakin kolmeksi vuodeksi. Lisäksi Turner ym. havaitsivat, että raato nosti kasvillisuuden biomassaa, ja kasvien typpipitoisuus oli noin vuoden ajan tavallista korkeampi jopa yhdeksän metrin säteellä raadosta. Raadot voivat myös muuttaa alueella laiduntavien eläinten käyttäytymistä – seeprat, hyppyantiloopit ja gnuut laidunsivat neljä kertaa todennäköisemmin pernarutolle altistuneilla alueella kuin kontrollialueella vuoden sisällä infektoituneen eläimen kuolemasta (Turner ym. 2014). Eläinten halukkuus laiduntaa pernarutolle altistuneilla alueilla johtuu todennäköisesti runsaammasta ja ravinteikkaammasta kasvillisuudesta (Turner ym. 2014). Laidunnus 1–2 vuoden kuluttua alueella, jossa eläin on kuollut pernaruttoon, onkin kasvinsyöjille tyypillisin tapa saada pernaruttotartunta (Turner ym. 2016).

4.3. Maaperän eliöt ja mikrobit

Maaperän eliökunta vaikuttaa *B. anthracis* -bakteerin säilymiseen maaperässä. Eri tutkimuksissa on selvitetty muun muassa ameebojen, kastematojen, sukkulamatojen ja bakteriofagien suhdetta *B. anthracis* -bakteerin selviytymiseen maaperässä (Laaberki & Dworkin 2008, Schuch & Fischetti 2009, Schuch ym. 2010, Dey ym. 2012).

B. anthracis -itiöt pystyvät germinoitumaan ja jakautumaan *Acanthamoeba castellanii* -ameebassa, joita elää maailmanlaajuisesti kosteissa maaperissä ja lammikoissa (Dey ym. 2012). Jakautumisen jälkeen bakteerit hajottavat ameeban ja sporuloituvat uudelleen, ja näin itiöiden määrä voi jopa 50-kertaistua kolmessa vuorokaudessa (Dey ym. 2012). *B. anthracis* -kannat,

joilta puuttuu pXO1-virulenssiplasmidi, eivät pysty Deyn ym. (2012) mukaan germinoitumaan ja jakautumaan ameebassa. Plasmideista pXO2 on epästabiilimpi, kun taas pXO1-plasmidin puuttuminen luonnon *B. anthracis* -kannoista on harvinaista (katsauksessa Swick ym. 2016). Tämä saattaakin johtua siitä, että pXO1 on *B. anthracis* -bakteerille ratkaiseva tekijä ameebaan liittyvässä elämänkierrrossa, kun taas pXO2-plasmidi ei ole siinä välttämätön (Dey ym. 2012).

Laaberki ja Dworkin (2008) havaitsivat, että sukkulamato *Caenorhabditis elegans*, jolle syötettiin vegetatiivisia *B. anthracis* -bakteereita ja itiöitä, pystyi tuhoamaan vegetatiiviset bakteerit suolistossaan. Itiöt olivat kuitenkin vastustuskykyisiä sukkulamadon ruuansulatuskanavan entsyymeille ja ne läpäisivät ruoansulatuskanavan vahingoittumattomina. Todennäköisesti itiön pinnan rakenne suojaa sitä madon ruuansulatusentsyymeiltä (Laaberki & Dworkin 2008). *C. elegans* -madon ruuansulatuksen nopeus riippuu ravinnon määrästä: jos sillä on vain vähän ravintoa saatavilla, ruuansulatus hidastuu (Liu & Thomas 1994). *B. anthracis* -itiöt kulkeutuivat madon ruuansulatuskanavan läpi hitaasti, mikä viittaa siihen, ettei madon ruuansulatuskanava tunnista niitä elollisiksi organismeiksi (Laaberki & Dworkin 2008).

B. anthracis -itiön ominaisuudet auttavat sitä säilymään vahingoittumattomana sukkulamadon ruuansulatuskanavassa. Kierrolla madon ruuansulatuskanavan läpi saattaakin olla merkitystä näiden ominaisuuksien kehittämisessä (Laaberki & Dworkin 2008). Laaberkin ja Dworkinin mukaan sukkulamatojen suolisto voisi toimia *B. anthracis* -bakteerin reservuaarina taudinpurkausten välillä.

Bakteriofageilla eli bakteereja infektioivilla viruksilla on keskeinen merkitys *B. anthracis* -bakteerin ja *Eisenia fetida* -madon eli tunkiolieron vuorovaikutuksessa (Schuch & Fischetti 2009). *B. anthracis* -bakteerin infektoiminen bakteriofagilla voi johtaa lysogeenien muodostumiseen eli siihen, että viruksen nukleiinihappoja yhdistyy bakteerin genomiin (Schuch & Fischetti 2009). Lysogeenit voivat muuttaa bakteerin kykyä selviytyä ja jakautua isäntäeläimen ulkopuolella, kuten esimerkiksi maaperässä, ritsosfäärissä, biofilmeissä ja sukkulamadoissa (Schuch & Fischetti 2009). Lysogeenit voivat myös muuttaa vegetatiivisten bakteerisolujen fenotyyppiä: ne voivat lisätä tai vähentää bakteerin sporulaatiota, lisätä biofilmiin tarvittavan eksopolysakkaridin tuottoa sekä mahdollistaa bakteerin selviytymisen pitkään maaperässä ja hapettomissa olosuhteissa *Eisenia fetida* -madon ruuansulatuskanavassa (Schuch & Fischetti 2009, Schuch ym. 2010). Schuchin ja Fischettin (2009) mukaan vain bakteriofagin infektoimat *B. anthracis* -bakteerit kykenevät asuttamaan *E. fetida* -madon ruuansulatuskanavan. *Bacillus cereus sensu lato* -ryhmään kuuluvat bakteerit, *B. anthracis* mukaan lukien, sekä bakteerien bakteriofagit ovat yleisiä *E. fetida* -matojen

ruuansulatuskanavassa (Schuch ym. 2010). Bakteriofagien välityksellä *B. anthracis* -bakteeri voikin päätyä sporulaation sijasta metabolisesti aktiivisiin tai symbioottisiin elämänmuotoihin maaperässä (Schuch & Fischetti 2009).

On huomionarvoista, että *B. anthracis* ja madot vaikuttavat suosivan samanlaista elinympäristöä. Kuten *B. anthracis* -itiöt, myös madot menestyvät parhaiten lievästi emäksisessä maaperässä, jossa on paljon orgaanista ainetta ja korkea kalsiumpitoisuus (Curry 2004, Reich ym. 2005). Pernaruttotaudinpurkauksia on yhdistetty tulviin (Durrheim ym. 2009, Lewerin ym. 2010), jolloin myös madot, kuten tunkioliero, hakeutuvat maaperän pintakerrokseen (Schuch ym. 2010). Elinolosuhteiden samankaltaisuus, bakteerin kyky elää tunkiolieron suolistossa sekä sateisille ajanjaksoille sijoittuvat taudinpurkaukset voisivat viitata siihen, että madoilla on rooli bakteerin reservuaarina sekä isäntäeläimen ulkopuolisessa elämäntierrossa (Schuch ym. 2010). Onkin esitetty hypoteesi, että tunkioliero voisi kuljettaa *B. anthracis* -itiöitä suolistossaan lähemmäs maan pintaa ja jopa kasvillisuuden päälle (Schuch ym. 2010). Aiheesta tarvitaan kuitenkin lisää tutkimusta taudinpurkauspaikoilta sekä alueilta, joilla pernarutto on endeeminen (Schuch ym. 2010).

4.4. Ilmasto

Pernaruttoa on raportoitu esiintyvän laiduntavissa villieläimissä ja nautakarjassa hyvin vaihtelevissa sääoloissa: kuivissa olosuhteissa (Muoria ym. 2007, Hampson ym. 2011), kuumina ja kuivina ajanjaksoina, joita on seurannut rankkoja sateita (Dragon ym. 1999, Turner ym. 1999, Himsworth 2008), kuivan ja sateisen ajanjakson välillä (Siamudaala ym. 2006, Mongoh ym. 2008) sekä sateisina ajanjaksoina (Lindeque & Turnbull 1994, Durrheim ym. 2009). Alueilla, joilla pernarutto on eläimillä yleinen tauti, taudinpurkauksia on yhdistetty äärimmäisiin sääolosuhteisiin (Hampson ym. 2011). Taudinpurkausten taustalla olevia mekanismeja voi kuitenkin olla vaikea todistaa. Tämä johtuu osin siitä, että pernaruttoa esiintyy eri eläinlajeilla erilaisissa sääolosuhteissa ja ekosysteemeissä (Turner ym. 2013).

Sateet vaikuttavat myös maaperässä oleviin itiöihin. Sateisen sään ja taudinpurkausten yhteyttä on selitetty sillä, että tulviva vesi voi nostaa maaperään hautautuneet *B. anthracis* -itiöt maan pintakerrokseen (katsauksessa Hugh-Jones & Blackburn 2009). Taudinpurkauksia nautakarjassa on yhdistetty tulviin maissa, joissa pernaruttoa ei esiinny endeemisenä, kuten Ruotsissa (Lewerin ym. 2010) ja Australiassa (Durrheim ym. 2009). Jos sadekautta edeltää kuiva ajanjakso, maaperä saattaa halkeilla, jolloin sadevesi pääsee huuhtelevaan maaperää

syvemmillä (Evira 2016a). Itiöt pysyvät hyvin veden pinnalla nosteen vaikutuksesta, ja ne kulkeutuvat maan pinnalle veden aiheuttaman kapillaari-ilmiön myötä (Bakken 1985). *B. anthracis* -itiöiden pinta on negatiivisesti varautunut, mikä auttaa itiöitä kiinnittymään maaperän humukseen ja orgaaniseen aineeseen (Chen 2010, Williams ym. 2013). Alueilla, joilla on runsaasti korkeuseroja, itiöt ja maa-aines valuvat korkeilta alueilta syvänteisiin virtaavan veden mukana. Kun vesilammikot haihtuvat, itiöt konsentroituvat maan pinnalle (katsauksessa Hugh-Jones & Blackburn 2009).

Sade lisää myös kasvillisuuden kasvua, mikä voisi tuoda maaperän itiöt paremmin laiduntavien eläinten ulottuville (katsauksessa Hugh-Jones & Blackburn 2009). Vesi voi myös nostattaa itiöitä hyönteisvektoreiden ulottuville (Hampson ym. 2011). Sateet lisäävät kärpäsentoukkien kehitystä aikuisiksi, jolloin pernaruttoa levittävien hyönteisten määrää kasvaa (katsauksessa Hugh-Jones & Blackburn 2009). Tunkiolierot, joiden ruuansulatuskanavassa *B. anthracis* voi säilyä, hakeutuvat sateen aikana maaperän pintakerrokseen (Schuch ym. 2010).

Sateisen ajanjakson aikana laiduntavien eläinten kontakti maaperään lisääntyy (Turner ym. 2013). Tämä saattaa johtua siitä, että sekä ruohoa että lehtiä syövät eläimet syövät ruohoa maanpinnan tuntumasta silloin, kun sitä on saatavilla sateisten ajanjaksojen aikana. Kuivina kausina maanpinnan kasvillisuus ei menesty, jolloin kasvinsyöjät syövät mieluummin esimerkiksi puiden lehtiä (Turner ym. 2013). Turner ym. (2013) havaitsivat, että sateisina ajanjaksoina laiduntavien villieläinten ruuansulatuskanavaan päättyy enemmän maa-ainesta kuin kuivina, ja sitä kautta myös riski itiöiden nielemiseen kasvaa. Kasvinsyöjät saattavat syödä maa-ainesta saadakseen mineraaleja, tahattomasti kasvillisuuden mukana tai puskuroidakseen ruuansulatuskanavan pH:ta silloin, kun niiden syövä ravinto on hyvin sulavaa (Ayotte ym. 2006).

Heikkoa ravitsemustilaa on myös ehdotettu tekijäksi, joka altistaa eläimiä pernarutolle (Hugh-Jones & de Vos 2002). Ruoho voi olla ravitsemukseltaan laadukampaa kasvukaudella kuin kuivana ajanjaksona, mutta kasvukauden lisääntynyt sademäärä ei välttämättä tarkoita, että ravinto olisi hyvälaatuista (Turner ym. 2013). Turner ym. (2013) havaitsivat kuitenkin tutkimuksessaan, että Etoshan kansallispuistossa eläinten ravitsemustila oli parempi sadekautena kuin kuivana ajanjaksona.

Kuivien ajanjaksojen ja taudinpurkausten yhteyttä on selitetty muun muassa sillä, että resurssien, kuten ravinnon ja juomaveden vähäisyys, nostaa eläintiheyttä. Kun suuri määrä eläimiä kokoontuu alueelle, jossa ravintoa ja vettä on vielä tarjolla, pernaruttoepidemian todennäköisyys kasvaa (Hugh Jones & de Vos 2002, katsauksessa Hugh-Jones & Blackburn

2009). Lisäksi eläimet, jotka syövät kuihtuneita kasveja maaperän tuntumasta, altistuvat enemmän maaperässä ja pölyssä oleville itiöille. Alhainen ilmankosteus lisää maaperän pölyämistä, jolloin inhalaation riski kasvaa (katsauksessa Dragon & Rennie 1995). Kuiva ja kortinen ravinto voi myös aiheuttaa haavaumia ruuansulatuskanavaan, mikä helpottaa itiöiden pääsyä isäntäeläimen verenkiertoon (WHO 2008). Myös kilpailua resursseista, kuumuutta, parasiitteja, lisääntymiskautta ja heikentynyttä vastustuskykyä on esitetty pernarutolle altistaviksi tekijöiksi kuivina ajanjaksoina (katsauksessa Dragon & Rennie 1995, Hugh-Jones & de Vos 2002, WHO 2008).

Ilmankosteus vaikuttaa vegetatiivisen *B. anthracis* -bakteerin elinkykyyn (U.S. EPA 2014). Kun vegetatiivisia bakteereja pidettiin lasilevyllä, ne selvisivät parhaiten korkeassa ilmankosteudessa. Tunnin kuluttua tutkimuksen aloittamisesta vegetatiivisia *B. anthracis* -bakteereja ei havaittu lainkaan, kun ympäristön suhteellinen kosteus oli 36 % (U.S. EPA 2014). Sen sijaan 92 %:n suhteellisessa kosteudessa vegetatiivisia bakteereja havaittiin vielä 12 tunnin kuluttua (U.S. EPA 2014).

B. anthracis -bakteerin elinkykyä tutkittiin myös kostutetussa ruokamullassa 93 %:n suhteellisessa ilmankosteudessa. Vegetatiiviset bakteerit säilyivät hengissä ja pystyivät jakautumaan ensimmäisten 24 tunnin aikana. Sen jälkeen jakautuminen lakkasi ja vegetatiiviset bakteerit alkoivat sporuloitua. Kahden vuorokauden kuluttua noin 10 % alkuperäisistä vegetatiivisista bakteereista oli sporuloitunut (U.S. EPA 2014). Vegetatiivisia bakteereja havaittiin kosteassa ruokamullassa 4–5 päivän ajan, ja vegetatiivisten solujen ja itiöiden seos säilyi jopa 56 päivää (U.S. EPA 2014).

Alueet, joilla pernarutto on endeeminen, sijaitsevat tyypillisesti lämpimässä ilmastossa (WHO 2008). Toisaalta pernaruttoa tavataan myös lähellä pohjoisnapaa. Yli 2300 poroa kuoli pernaruttoon Jamalin Nenetsiassa Länsi-Siperiassa kesällä 2016. Alueella tavattiin pernaruttoa edellisen kerran 75 vuotta sitten, ja tuhansien kuolleiden porojen jäänteet olivat jääneet tundralle epidemian jäljiltä (Evira 2016a). Tutkijat arvioivat jo vuonna 2011, että ilmaston lämpeneminen saattaisi johtaa pernaruttoepidemioihin Siperiassa (Revich & Podalnaya 2011). Kesä 2016 oli poikkeuksellisen lämmin Jamalin Nenetsiassa, ja tämän arvioidaan johtaneen ikiroudan sekä maahan haudattujen raatojen sulamiseen, jolloin porot joutuivat kosketuksiin pernaruttoitiöiden kanssa (Evira 2016a). Siperian epidemia on osoitus siitä, että jos itiöt ovat sporuloituneet kunnolla, ne voivat säilyä elinkykyisinä myös alhaisissa lämpötiloissa.

Liian matalissa tai korkeissa lämpötiloissa sporulaatio voi jäädä vaillinaiseksi tai sitä ei tapahdu ollenkaan, jolloin bakteerisolut kuolevat (katsauksessa Hugh-Jones & Blackburn 2009).

Kirjallisuudessa on esitetty useita arvioita *B. anthracis* -bakteerille optimaalisista sporulaatio- ja germinaatiolämpötiloista. Howie (1949) havaitsi, että kun *B. anthracis* -bakteereja viljeltiin 37 °C:ssa, ne muodostivat itiöitä kuudessa tunnissa. 0–4 °C:ssa bakteerit eivät sporuloituneet lainkaan, vaan ne kuolivat kuuden vuorokauden kuluessa (Howie 1949). Minettin (1950) mukaan sporulaation määrä kasvaa ja sporulaatio nopeutuu lämpötilan kohotessa: 21 °C:ssa sporulaatio tapahtuu 24 tunnissa, 26 °C:ssa 18 tunnissa, 32 °C:ssa 10 tunnissa ja 36 °C:ssa kahdeksassa tunnissa.

Davies (1960) esitti, että *B. anthracis* -itiöiden optimaalinen germinoitumislämpötila olisi 39 °C, mikä vastaa monien nisäkkäiden normaalia ruumiinlämpöä. Daviesin mukaan germinaatio vähenee lämpötilan noustessa tai laskiessa, ja 18 °C:n lämpötilassa germinaatiota ei enää tapahdu. Titballin & Machee (1987) havaitsivat, että optimaalisin lämpötila germinaatiolle oli 22 °C, kun itiötä altistettiin germinaatiota edesauttavalle L-alaniinille. Germinaatiota tapahtui myös 9 °C:ssä, mutta se oli hyvin vähäistä. Tutkimuksessa havaittiin germinaation olevan varsin nopea tapahtuma: 30 °C:ssa yli 99 % itiöistä germinoitui kymmenessä minuutissa (Titball & Manchee 1987).

Virulentilla *B. anthracis* -bakteerilla on HtrA-geeni, jolla on suuri vaikutus bakteerin itiön lämmönkestävyyteen (Chitlaru ym. 2011). Tutkimuksissa, joissa HtrA-geeni hiljennettiin, bakteerit kasvoivat normaalisti 37 °C:ssa, mutta 42 °C:n lämpötilassa ne eivät enää kasvanee (Chitlaru ym. 2011).

Baweja ym. (2008) havaitsivat, että sporulaation aikaiset olosuhteet, kuten pH, lämpötila ja ravintoaineiden saatavuus, vaikuttavat *B. anthracis* -itiön ominaisuuksiin ja sporulaation keston. Sporulaatio tapahtui nopeammin emäksisessä ympäristössä (pH 9,0) kuin neutraalissa (pH 7,0) tai happamassa (pH 5,0). Itiöt, joilla oli vain niukasti ravinteita saatavilla sporulaation aikana, olivat herkkiä denaturoiville aineille (Baweja ym. 2008). 45 °C:n lämpötilassa sporuloituneet itiöt olivat kooltaan pienimpiä, mutta ne germinoituivat parhaiten ja muodostivat eniten dipikoliinihappoja (Baweja ym. 2008), jotka ovat merkityksellisiä itiön kyvyssä sietää korkeita lämpötiloja sekä kemikaaleja (Foerster & Foster 1966, katsauksessa Driks 2009).

B. anthracis -itiöt tuhoutuvat parhaiten kuumissa ja kosteissa olosuhteissa (Buhr ym. 2015). Itiöt tuhoutuvat 90 °C:ssa 20 minuutissa ja 100 °C:ssa 10 minuutissa, kun ilmankosteus on korkea (Spotts Whitney ym. 2003). Keittäminen 100-asteisessa vedessä tappaa itiöt niiden määrästä riippuen 5–10 minuutissa (Spotts Whitney ym. 2003).

Itiöiden kylmänsietokykyä on tutkittu vähemmän. Almeida ym. (2008) havaitsivat, ettei itiöiden säilyttäminen steriilissä vedessä -80 °C:ssa 300 päivän ajan vähentänyt niiden elinkykyä.

4.5. UV-säteily

B. anthracis -itiön ytimessä on runsaasti dipikoliinihappoja sekä proteiineja, jotka suojaavat sen DNA:ta UV-säteilyltä (katsauksessa Driks 2009). Itiön herkkyyttä keinotekoiselle UVA- ja UVB-valolle on tutkittu erilaisilla pinnoilla ja materiaaleilla, kuten lasilla, maalaamattomalla betonilla, mäntypuulla ja pintamaassa (U. S. EPA 2010). Käyttämällä pesäkettä muodostavien yksiköiden lukumäärää itiöiden elinkyvyn mittarina on todettu, että *B. anthracis* -itiöt selvisivät parhaiten 100 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ UVA-säteilystä ja 70 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ UVB-säteilystä pintamaassa. Lähes kaikki itiöt säilyivät elinkykyisinä 28 vuorokautta (U. S. EPA 2010). Muilla materiaaleilla itiöiden elinkyky heikkeni, ja lasin päällä olleet itiöt kestivät UV-altistusta vähiten (U. S. EPA 2010).

Vegetatiiviset *B. anthracis* -bakteerisolut eivät sporuloituneet pintamaassa, kun niitä altistettiin laboratorio-olosuhteissa keinotekoiselle UVA- ja UVB-säteilylle (U. S. EPA 2014). Vegetatiivisia bakteereja pystyttiin eristämään ja viljelemään vielä 96 tunnin kuluttua UV-altistuksen alkamisesta, kun UVA:n ja UVB:n suhde oli matala eli vastasi ulkoilman olosuhteita aurinkoisena kesäpäivänä. Kun UVA/UVB-suhde oli korkea, tulokset olivat samanlaiset (U. S. EPA 2014). UV-säteilylle altistetut bakteerit elpyivät heikommin kuin kontrolliryhmä, jota ei säteilytetty, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä (U. S. EPA 2014). Tutkimus antaa viitteitä siitä, että UVA-säteilyllä ei olisi suurta vaikutusta vegetatiivisten bakteerien elinkykyyn. Luonnossa maaperä saattaa peittää ja varjostaa *B. anthracis* -bakteereja ja itiöitä, mikä vähentää niiden altistumista UV-säteilylle (U. S. EPA 2014).

Itiöt, jotka ovat sporuloituneet 45 °C:ssa, sietävät UVC-säteilyä paremmin kuin 25 °C:ssa sporuloituneet itiöt (Baweja ym. 2008). Emäksisessä (pH 9,0) ja happamassa (pH 5,0) sporuloituneet itiöt sietävät UVC-säteilyä heikommin kuin neutraalissa (pH 7,0) ympäristössä sporuloituneet itiöt. Itiöt, joilla on vain vähän ravintoaineita saatavilla sporulaation aikana, ovat kaikkein herkimpiä UVC-säteilylle (Baweja ym. 2008).

4.6. Hyönteiset

Pernaruton ja hyönteisten, etenkin raatokärpästen ja purevien hyönteisten, yhteyttä toisiinsa on spekuloitu pitkään (Blackburn ym. 2014a). Pernaruttoon kuolleen eläimen raato ja eritteet houkuttelevat paikalle raatokärpäsiä ja niiden toukkia, ja ruokaillessaan raatokärpäset saavat elimistöönsä vegetatiivisia bakteereja ja itiöitä (katsauksessa Hugh-Jones & Blackburn 2009). Ruokailtuaan raatokärpäset siirtyvät lähellä olevien kasvien lehdille ja oksentavat osan ravinnostaan (Braack & de Vos 1990). Raatokärpäset voivat kantaa *B. anthracis* -bakteeria ruuansulatuskanavassaan muutamia päiviä (Terzi ym. 2014), ja tänä aikana myös kärpästen ulosteet voivat sisältää vegetatiivisia bakteereja. *B. anthracis* ei kuitenkaan pysty lisääntymään kärpäsen ruuansulatuskanavassa (Terzi ym. 2014). Ulosteen vegetatiiviset bakteerit sporuloituvat joutuessaan kosketuksiin ilmakehän hapen kanssa.

Blackburn ym. (2014b) ottivat näytteitä hyönteisistä ja kasvillisuudesta pernaruttoon kuolleen eläimen läheisyydestä. Tutkimuksessa 3–5 metrin säteellä olleista hyönteisistä löydettiin elinkykyistä *B. anthracis* -bakteeria. Kasvillisuudesta ei löydetty elinkykyistä bakteeria, mutta *B. anthracis* voitiin osoittaa PCR:llä (Blackburn ym. 2014b).

Pernaruttoepidemiat isokuduissa (*Tragelaphus strepsiceros*) ja njaloissa (*Tragelaphus angasi*) on yhdistetty Etelä-Afrikassa ja Zimbabwessa raatokärpästen suuriin määriin (Braack & de Vos 1990, Clegg ym. 2007). Myös Texasissa, Yhdysvalloissa, *B. anthracis* -bakteerin itiöitä on eristetty raatokärpäsisistä tilalta, jossa valkohäntäpeuroilla oli tavattu pernaruttoa (Blackburn ym. 2010). Suurin osa raatokärpäsen välittämistä taudinpurkauksista on yhdistetty kuiviin ajanjaksoihin tai talveen. Syyksi on esitetty sitä, että sade huuhtoo kärpästen eritteet kasvillisuuden päältä (katsauksessa Hugh-Jones & Blackburn 2009).

Myös hematofaagiset eli verta ravintonaan käyttävät hyönteiset, kuten paarmat, voivat toimia vektoreina kasvinsyöjien pernaruttoinfektiossa: ne lisäävät paitsi tartuntojen määrää paikallisesti, myös levittävät tautia laajemmalle alueelle. Paarmoja (*Tabanidae*) pidetäänkin tärkeinä tartunnanvälittäjinä valkohäntäpeuran ja biisonin tautitapauksissa Pohjois-Amerikassa (katsauksessa Hugh-Jones & Blackburn 2009). Texasissa verta ravintonaan käyttäviä hyönteisiä havaittiin eniten alueilla, joissa oli eniten pernaruttoon kuolleiden valkohäntäpeurojen raatoja (Blackburn ym. 2014a). Verta ravintonaan käyttävien hyönteisten on arvioitu levittävän pernaruttoa myös seeproissa, hevosissa ja virtahevoissa Afrikassa sekä poroissa Venäjällä (Bengis & Frean 2014).

Verta ravintonaan käyttävien hyönteisten välittämiä epidemioita on yleensä edeltänyt sateinen ajanjakso, ja taudinpurkaukset ovat sijoittuneet kevääseen tai alkukesään (katsauksessa Hugh-Jones & Blackburn 2009). Runsaat sateet edistävät karpäsentoukkien kehittymistä aikuisiksi (katsauksessa Hugh-Jones & Blackburn 2009) eli lisäävät tautia levittävien vektoreiden määrää.

Pernaruttoa on eristetty myös punkeista (*Ornithodoros megnini*) (Stiles 1944), huonekärpäsisistä (*Musca domestica*) (Fasanella ym. 2010), keltakuumehyttysistä (*Aedes aegypti*) ja pistokärpäsisistä (*Stomoxys calcitrans*) (Turell & Knudson 1987).

4.7. Haaskaeläimet

Pernaruttoon kuolleen eläimen raato houkuttelee hyönteisten lisäksi paikalle myös haaskaeläimiä. Haaskaeläinten avaamasta raadosta valuu eritteitä, jotka kontaminoivat ympäröivää maaperää bakteereilla (katsauksessa Hugh-Jones & Blackburn 2009). *B. anthracis* -bakteeria voi olla pernaruttoon kuolleen eläimen veressä jopa 10^7 – 10^9 pesäkkeen muodostavaa yksikköä (CFU) millilitrassa (Lindeque & Turnbull 1994).

Bakteerit sporuloituvat elimistön ulkopuolella ja itiöt voivat levitä laajemmalle alueelle esimerkiksi tulvien tai tuulen mukana. Avaamattomassa raadossa sporulaatiota ei kuitenkaan tapahdu juuri ollenkaan (katsauksessa Dragon & Rennie 1995). Jos raatoa ei avata, suoliston anaerobiset mädättäjäbakteerit alkavat lisääntyä nopeasti (katsauksessa Dragon & Rennie 1995). Koska vegetatiiviset *B. anthracis* -bakteerit ovat herkkiä mikrobien väliselle kilpailulle, ne tuhoutuvat raadossa 2–4 vuorokauden kuluessa (Minett 1950). Haaskaeläinten takia olisikin tärkeää, että raadot hävitettäisiin nopeasti tai tehtäisiin haaskaeläimille vähemmän houkutteleviksi.

Niillä tiloilla, joiden laiumilla havaittiin petoeläimiä, kuten kojootteja, oli neljä kertaa todennäköisemmin pernaruttoa kuin tiloilla, jotka eivät raportoineet petoeläimistä (Mongoh ym. 2008). Petojen läsnäolo voi selittää myös sitä, miksi naudan sairastuminen pernaruttoon lisää taudin todennäköisyyttä myös naapuritiloilla (Mongoh ym. 2008). Haaskaeläimet voivat levittää pernaruttoa siirtelemällä raatoa tai sen osia (katsauksessa Hugh-Jones & Blackburn 2009). *B. anthracis* -itiöt voivat kulkeutua vahingoittumattomina raadonsyöjien, kuten korppikotkien, sakaalien ja hyenojen ruuansulatuskanavan läpi (Houston & Cooper 1975, Lindeque & Turnbull 1994), jolloin pernarutto voi levitä myös ulosteiden välityksellä. Tavallisesti raadonsyöjäeläimet ovat melko vastustuskykyisiä pernarutolle, mutta myös tautitapauksia on tavattu, ja esimerkiksi korppikotkista on löydetty vasta-aineita

pernaruttotoksiinin suojaavalle antigeenille (Turnbull ym. 2008). Haaskaeläimet voivat levittää pernaruttoitiöitä myös sulka- tai karvapeitteessään, ja lintujen mukana itiöitä voi kulkeutua kauas infektiopaikasta (katsauksessa Dragon & Rennie 1995).

4.8. Tuotantoeläinten rehu ja laiduntaminen

Maissa, joissa maanviljely on pitkälle kehittynyttä, kontaminoitunut rehu on tavallisin pernaruttotartunnan lähde etenkin naudoilla (WHO 2008). Ruotsissa tavattiin pernaruttoa lihakarjassa vuonna 2010, ja taudinpurkauksen todennäköisimpänä aiheuttajana pidettiin rehua (Lewerin ym. 2010). Rehua oli viljelty alueella, jossa pernaruttoon kuolleiden eläinten raatoja oli heitetty jokeen 1900-luvun alussa. Rehuun oli valmistusvaiheessa sekoittunut maaperää ja pölyä, joka oli todennäköisesti itiöiden saastuttamaa (Lewerin ym. 2010). Ruotsissa sairastunutta karjaa pidettiin navetassa (Lewerin ym. 2010), mutta yhtä lailla laiduntavat eläimet voivat saada maaperän ja pölyn mukana pernaruttoitiöitä ruuansulatuskanavaansa (Turner ym. 2013).

Mikäli maaperässä on *B. anthracis* -itiöitä, kasvinsyöjien alttius niille on kaikkein suurin kasvillisuuden kasvukaudella (Turner ym. 2013). Tällöin kasvien maittavuus on suuri, maaperä on kostea ja ruoho on vielä matalaa, jolloin eläimet syövät todennäköisemmin kasvin juurineen, ja kontakti maaperän kanssa kasvaa (Turner ym. 2013). Eläimet saattavat saada maa-ainesta ruuansulatuskanavaansa tahattomasti laiduntaessaan, mutta ne saavat maaperästä myös mineraaleja ja voivat puskuroida sillä ruuansulatuskanavan pH:ta (Ayotte ym. 2006). Riittävän monipuolinen ja tasapainoinen ravinto saattaisikin vähentää laiduntavien nautojen kontaktia maaperän kanssa ja siten pienentää riskiä sairastua pernaruttoon.

BSE-riskin takia nisäkäspärisen valkuaisen, kuten lihan ja liha-luujauhon käyttäminen märehtijöiden ravinnoksi on ollut Suomessa ja muissa EU-maissa kiellettyä 2000-luvun alusta alkaen (EPNa 999/2001). Ennen pernaruton tarttuminen kontaminoituneen eläinperäisen rehun välityksellä on kuitenkin ollut yleistä. Esimerkiksi Hugh-Jones ja Hussaini (1975) havaitsivat yhteyden nautojen pernaruttotaudinpurkausten määrän sekä lihan ja luujauhon maahantuonnin välillä Isossa-Britanniassa vuosina 1938–1972. Toisaalta maissa, joissa tuotantoeläinten rehun laatua ei säädellä lailla, tartunnat liha-luujauhon välityksellä ovat yhä mahdollisia (Rume ym. 2016).

4.9. Maatalous ja kemikaalit

Pernaruttotartunnat on yhdistetty kirjallisuudessa korkeaan karjatiheyteen, alhaiseen väestötiheyteen ja maaseutuun (Kracalik ym. 2013, Chen ym. 2016). Eläinperäisten tuotteiden, kuten raa'an lihan, villan, nahan, luiden ja luusta peräisin olevien tuotteiden parissa työskentelevät ihmiset ovat altteimpia pernaruttoinfektion saamiseen (WHO 2008).

Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa tavataan toisinaan sporadisia eli satunnaisia pernaruttotapauksia maansiirtotöiden yhteydessä (Bengis & Frean 2014). Esimerkiksi ojien kaivaminen, vesiputkien asentaminen maahan ja metsien raivaaminen pelloksi voivat nostaa pernaruttoitiöt maan pintaan (WHO 2008).

Myös maataloudessa käytettävien kemikaalien ominaisuudet tulisi huomioida alueilla, joilla on tavattu pernaruttoa. Esimerkiksi kalsiumoksidia on käytetty maataloudessa desinfiointiaineena vuosisatojen ajan (Himsworth 2008). Kalsiumoksidi on emäksinen aine, joten se tuhoaa hyvin monia bakteereja ja jopa viruksia hajottamalla niiden lipidikomponentteja, kuten kalvorakenteita. Kalsiumoksidi hajottaa bakteerien soluseinää, kun pH nousee yli 10:een (Himsworth 2008).

Kalsiumoksidin käyttöä on aiemmin suositeltu pernarutolla kontaminoituneiden alueiden desinfioimiseksi esimerkiksi Kanadassa (Himsworth 2008). Nykyään kalsiumoksidin käyttöä pyritään välttämään, sillä *B. anthracis* -itiöiden altistaminen kalsiumille voi parantaa itiöiden elinkykyä (Himsworth 2008). Maaperän kalsium estää kalsiumin vuotamista ulos itiöstä, millä on suotuisia vaikutuksia itiön säilyvyyteen maaperässä (katsauksessa Dragon & Rennie 1995, Himsworth 2008, White ym. 2012). On myös havaittu, ettei kalsiumoksidi pysty juurikaan tuhoamaan bakteereiden itiöitä, ja lisäksi kalsiumoksidin emäksisyys tekee maaperästä itiöille suotuisamman elinympäristön (Himsworth 2008).

4.10. Raatojen hävittäminen ja alueen desinfektio

Suurimmassa osassa maita, joissa pernaruttoa esiintyy, kuolleet eläimet hävitetään polttamalla (WHO 2008). Suomessa pernaruttoon kuolleen eläimen hautaaminen on lähtökohtaisesti kiellettyä (MMM 24/2013, 3 §), mutta hautaamiseen voidaan myös myöntää poikkeuslupa (MMM 24/2013, 4 §). Jos pernaruttoon kuollut eläin haudataan maahan, *B. anthracis* -itiöt voivat nousta uudelleen maaperän pintaan muun muassa sateiden, eroosion tai maansiirtotöiden

takia (Bengis & Frean 2014). Monet taudinpurkaukset on yhdistetty alueelle aikaisemmin haudattuihin, pernaruttoon kuolleisiin eläimiin (Evira 2016a).

Bacillus anthracis ei sporuloidu kuollessa isäntäeläimessä (katsauksessa Dragon & Rennie 1995), jos eläintä ei avata. Kuolleen eläimelle ei tule tehdä raadonavausta, jos sillä epäillään pernaruttoa, jotta bakteerit eivät leviä ympäristöön ja sporuloidu (Bengis & Frean 2014). Raato tulee suojata haaskaeläimiltä, ja se voidaan tehdä niille vähemmän houkuttelevaksi 5 % formaldehydikäsittelyllä (Nishi ym. 2002).

Pernaruton taudinkuvaan kuuluu yleensä verenvuotoa ruumiinaukoista, jolloin bakteerien vapautuminen ympäristöön on todennäköistä. Veren kontaminoima maaperä ja kasvillisuus tulisi polttaa raadon mukana (Bengis & Frean 2014, Wall ym. 2015) tai käsitellä 5 % formaldehydillä (Nishi ym. 2002). Formaldehydi tuhoaa tehokkaasti *B. anthracis* -itiöitä laboratorio-olosuhteissa (Spotts Whitney ym. 2003). Jos kontaminoitunut maa-alue on suuri, riittävän ja tasaisen kemikaalipitoisuuden aikaansaaminen maaperään voi olla haastavaa (Himsworth 2008). Formaldehydi on myös ihmisen terveydelle haitallinen.

4.11. Taudin vastustaminen ja hoito

Pernaruton vastustamisella tauti on saatu vähenemään monissa maissa. Maissa, joissa pernarutto on harvinainen, karjanomistajat ja eläinlääkärit eivät välttämättä tunnista taudin kliinistä kuvaa. Tämä voi johtaa taudin alidiagnosointiin ja siihen, etteivät tapaukset aina päädy terveystietojärjestelmien tietoon (WHO 2008).

Ihmisillä pernaruttoa voidaan hoitaa laajakirjoisilla antibiooteilla, kuten doksisykliinillä ja siprofloksasiinilla, sekä oireidenmukaisella hoidolla (WHO 2008). Tautiepäilyssä ihmisillä voidaan käyttää myös ehkäisevää antibioottihoitoa (WHO 2008). Eläimillä, etenkin pernarutolle herkällä märehtijöillä, tauti etenee yleensä niin nopeasti, että sen diagnosoiminen riittävän aikaisin hoidon onnistumiseksi on vaikeaa (Bengis & Frean 2014). Tautia voidaan kuitenkin yrittää hoitaa lääkitsemällä eläintä penisilliinillä ja tetrasykliinillä (WHO 2008, Bengis & Frean 2014). Suomessa eläimillä aloitetaan mikrobilääkitys viipymättä, jos niiden epäillään sairastuneen pernaruttoon (MMM 24/2013, 3 §). Kaikissa maissa pernaruton hoitaminen antibiooteilla ei kuitenkaan ole sallittua, vaan eläimet on teurastettava ja ruhot hävitettävä (WHO 2008).

Nautoja rokotetaan pernaruttoa vastaan maailmanlaajuisesti etenkin maissa, joissa taudinpurkauksia ja sporadisia tautitapauksia esiintyy vuosittain (WHO 2008).

Maailmanlaajuisesti käytetyin rokote on immunologi Max Sternin vuonna 1937 kehittämä elävä heikennetty, itiöitä muodostava 34F2-variantti, jolta puuttuu pXO2-plasmidi eli se ei pysty muodostamaan kapselia (Gorantala ym. 2014). Jotta eläimet saisivat riittävän suojan pernaruttoa vastaan, ne tulisi rokottaa vuosittain (Mongoh ym. 2008). Tehosterokotteen antaminen 2–3 viikkoa ensimmäisestä rokotuksesta parantaa immuunivasteen muodostumista (Mongoh ym. 2008). Keski- ja Itä-Euroopassa käytetään 34F2:ta vastaavaa, pXO2-negatiivista kanta 55:tä (OIE 2012). Suomessa pernaruttorokotteita ei ole saatavilla (THL 2016), koska pernaruttoa esiintyy vain harvoin ja sporadisesti.

Rokotuksista olisi eniten hyötyä säännöllisesti annettuina, osana pernaruton vastustamisohjelmaa, mutta usein rokottamista käytetään reaktiona karjassa havaittuihin tautitapauksiin (Blackburn ym. 2007, Mongoh ym. 2008). Reaktiivinen lähestymistapa lisää todennäköisyyttä uusille taudinpurkauksille, kun *B. anthracis* -itiöitä päätyy sairastuneesta eläimestä ympäristöön (Blackburn ym. 2007). Tiloilla, jotka raportoivat aloittavansa rokotukset vasta tautitapauksien ilmettyä, tavattiin pernaruttoa todennäköisemmin kuin tiloilla, jotka rokottivat eläimet pernaruttoa vastaan ennen taudinpurkauksia. Myös eläinten rokottaminen vain kerran lisää taudinpurkausten todennäköisyyttä tilalla kahteen rokotuskertaan verrattuna (Mongoh ym. 2008). Rokotetta ja mikrobilääkitystä ei tulisi antaa eläimelle yhtäaikaaisesti, sillä ne saattavat kumota toistensa vaikutuksia (Mongoh ym. 2008).

Vaikka pernaruttorokotteita on maailmalla hyvin saatavilla ja ne ovat edullisia, injektiorokote ei ole mielekäs tapa villieläinten pernaruttoinfektioiden torjumiseen (Blackburn ym. 2007). 34F2-rokotteella on myös havaittu olevan paikallisia ja systeemisiä sivuvaikutuksia jäännösvirulenssin takia (Wang & Roehrl 2005). 2000-luvulla onkin alettu kehittää uusia, suun kautta annosteltavia rokotteita, jotka olisivat tehokkaampia ja sopisivat sekä ihmisille että eläimille. Gorantala ym. (2014) saivat lupaavia tuloksia syötävän, kasvipohjaisen rokotteen immunisaatiosta antaessaan rokotetta hiirille. Syötävän rokotteen tehosta eri eläinlajeilla tarvitaan kuitenkin lisää tutkimusta ennen kuin rokote saadaan markkinoille. Maastoon levitettävät, syötävät rokotteet voisivat kuitenkin olla ratkaisu pernaruton vastustamiseen villieläimillä.

5. TAUDINPURKAUKSILLE ALTTIIDEN ALUEIDEN TUNNISTAMINEN

Pernaruton vastustamiseksi olisi tärkeää tietää, mitkä alueet ovat erityisen riskialttiita taudinpurkauksille. Tuotantoeläimillä pernaruttoa voidaan vastustaa raatojen oikeaoppisella hävittämisellä, desinfektiolla ja ulkomailla myös rokotuksilla, mutta villieläinten kohdalla tilanne on monimutkaisempi. Kun tunnetaan maantieteelliset alueet, joilla pernaruttotaudinpurkaukset ovat todennäköisimpiä, alueille voidaan kohdistaa enemmän valvontaa ja villieläinten tarkkailua voidaan lisätä.

Ekologisen lokeron mallintaminen (ecological niche modeling) on työkalu, jolla voidaan arvioida eri lajien levinneisyyttä (Peterson 2001). Ekologinen lokero tarkoittaa ympäristötekijöiden muodostamaa tilaa, jossa laji tai populaatio voi elää, lisääntyä ja levitä (Tieteen termipankki 2015). Ekologisen lokeron mallintamisessa määritellään ensin kohde-eliön ekologinen lokero sen tiedetyn levinneisyyden perusteella. *B. anthracis* -bakteerin tapauksessa malliin syötetään tietoja aiemmista taudinpurkauksista (Peterson 2001).

Eliön maantieteellistä ja ekologista jakautumista ennustettaessa analysoidaan eliön kannalta keskeisiä ympäristön muuttujia (Peterson 2001). *B. anthracis* -bakteerin tapauksessa tärkeimpiä muuttujia ovat muun muassa keskilämpötila, sademäärä, maaperän kosteus ja pH, ympäristön korkeuserot sekä normalisoitu kasvillisuusindeksi, joka kertoo vihreän kasvillisuuden määrän alueella (Blackburn ym. 2007). Muuttujia voidaan analysoida esimerkiksi GARP-algoritmillä (Genetic Algorithm for Rule-Set Prediction), joka määrittää yhteyksiä taudinpurkausalueiden ja ympäristön parametrien väliltä (Stockwell & Peters 1999). Mitä enemmän muuttujia alueella täyttyy, sitä suurempi riski alueella on pernaruttotaudinpurkauksiin (Blackburn ym. 2007). Mallinnuksia voidaan tehdä laajoille, kokonaisia valtioita kattaville maantieteellisille alueille tai pienemmille, vaikkapa osavaltion kokoisille alueille (Blackburn ym. 2007).

Mallintamisen avulla voidaan ymmärtää paremmin itiöiden jakautumista ja säilymistä sekä ennustaa, mitkä alueet ovat alttiimpia pernaruttotaudinpurkauksille. Maantieteelliset mallit voivat myös auttaa luonnollisten taudinpurkauksien erottamisessa teollisuudessa tapahtuneesta kontaminaatiosta sekä bioterrorismistä: mikäli tautitapauksia esiintyy alueilla, jotka sijaitsevat mallinnusten ulkopuolella, voi olla syytä tehdä tarkempia epidemiologisia tutkimuksia taudin alkuperästä (Blackburn ym. 2007).

Yhdysvalloissa *B. anthracis* -bakteerin levinneisyyttä ennustettiin 48:ssa osavaltiossa. Bakteerin levinneisyysalueeksi saatiin kapeahko alue, joka ulottuu Texasista pohjoiseen Oklahoman, Kansasin ja Nebraskan läpi Etelä- ja Pohjois-Dakotaan sekä Minnesotaan

(Blackburn ym. 2007). Malli osasi ennustaa 76,8 %:n tarkkuudella taudinpurkausalueet, jotka algoritmiin oli syötetty mallin luomiseksi, ja se ennusti hyvin myös taudinpurkausalueita, joita ohjelmaan ei ollut syötetty (Blackburn 2007).

Australiassa tuotantoeläinten pernaruttotapausten määrä on vähentynyt, ja taudinpurkaukset ovat keskittyneet 1950-luvulta alkaen pienemmälle maantieteelliselle alueelle (Barro ym. 2016). Enemmistö tautitapauksista sijoittuu maan itäosaan, joka ennustettiin myös GARP-analyysissä riskialueeksi (Barro ym. 2016). Muuttujat, jotka rajoittivat *B. anthracis* -bakteerin jakautumista eniten, olivat pH, kalsiumsulfaatin ja orgaanisen aineen määrä maaperässä sekä sademäärä (Barro ym. 2016).

B. anthracis -bakteerin ekologista lokeroa ja levinneisyyttä on mallinnettu myös Zimbabwessa, Nigeriassa, Kamerunissa, Tsadissa, Kazakstanissa ja Italiassa (Chikerema ym. 2013, Mullins ym. 2013, Blackburn ym. 2015). Mullins ym. (2013) vaihtoivat Italian, Yhdysvaltojen ja Kazakstanin maakohtaisia ekologisia malleja keskenään selvittääkseen voidaanko *B. anthracis* -bakteerin levinneisyyttä ennustaa myös toisissa maissa. Tutkimuksessa havaittiin, että kullekin alueelle tulisi kehittää omat ekologiset mallinsa (Mullins ym. 2013).

Pernaruttotaudinpurkauksille alttiita alueita ei ole vielä mallinnettu Suomessa *B. anthracis* -bakteerin ekologisen lokeron avulla. Riskialueiden mallintaminen voisikin olla hyödyllinen työkalu pernaruttotaudinpurkausten ymmärtämiseksi.

6. PERNARUTTO SUOMESSA

Pernarutto on ollut Suomessa yleinen eläintauti vielä 1940–1950-luvuilla. 1950-luvun puolessavälissä taudin esiintyminen alkoi vähentyä. 1960-luvun jälkeen Suomessa on ilmennyt pernaruttoa harvakseltaan. Pernaruttoa on tavattu Suomessa kaksi kertaa 2000-luvulla (Evira 2009, Andersson ym. 2011).

6.1. Lainsäädäntö ja pernaruton vastustaminen Suomessa

Suomessa pernarutto on vaarallinen, lakisääteisesti vastustettava eläintauti ja zoonoosi (MMMä 843/2013, 1 §, 4 §). Virkaeläinlääkäri ilmoittaa tautiepäilystä aluehallintoviraston läänineläinlääkärille, joka ilmoittaa asiasta Elintarviketurvallisuusvirastolle (MMMä 1010/2013, 11 §). Taudin toteamisesta ilmoitetaan alueen terveyskeskukseen tartuntataudeista vastaavalle lääkärille seuraavaan arkipäivään mennessä (MMMä 1010/2013, 15 §).

Maa- ja metsätalousministeriön asetuksessa pernaruton vastustamisesta kerrotaan toimintaohjeista tautia epäiltäessä tai kun se on todettu (MMMä 24/2013). Lisäksi Evira on tehnyt ohjeet eläinlääkäreille muun muassa näytteiden ottamisesta, pakkaamisesta ja lähettämisestä (Evira 2017).

Jos eläimen epäillään kuolleen pernaruttoon, sille ei saa tehdä pitopaikassa raadonavausta. Kuollut eläin eristetään muista eläimistä, ja haaskaeläinten pääsy ruhon luokse estetään (MMMä 24/2013, 3 §). Aluehallintovirasto antaa päätöksen taudin leviämisen estämiseksi tilalla, jossa pernaruttoa epäillään tai tauti on todettu.

Jotta tauti ei leviäisi, tilalta ei saa viedä eikä sinne saa tuoda sorkkaeläimiä tai hevosia (MMMä 24/2013, 3 §). Tilalta ei saa viedä pois maitoa, lihaa tai muita eläinperäisiä tuotteita, lantaa, rehua, kuivikkeita tai muita aineita ja välineitä, jotka saattavat levittää pernaruttoa (MMMä 24/2013, 3 §). Sairastuneet ja sairaiksi epäillyt eläimet eristetään muista eläimistä ja lääkitään mikrobilääkkeillä (MMMä 24/2013, 3 §). Verta vuotava ruho tulee mahdollisuuksien mukaan pakata kestäväan säkkiin ja toimittaa poltettavaksi eläinjätteenkäsittelylaitokseen Honkajoelle (Honkajoki 2013, Evira 2016b).

Asetus pernaruton vastustamisesta kieltää tautiin kuolleen eläimen hautaamisen maahan (MMMä 24/2013, 3 §), mutta toisaalta hautaamiseen voidaan myös myöntää poikkeuslupa (MMMä 24/2013, 4 §). Poikkeuslupa voitaisiin myöntää esimerkiksi tilanteessa, jossa tautitapaus on ilmennyt Honkajoen keräilyalueen ulkopuolella eli syrjäiseksi luokitellulla

alueella. Märehtijöiden keräilyalueeseen kuuluvat Etelä-Suomen, Länsi-Suomen, Sisä-Suomen, Lounais-Suomen, Itä-Suomen ja Pohjois-Suomen aluehallintovirastojen alueet lukuun ottamatta Kuusamo, Taivalkoske, Hyrynsalme, Kuhmo, Suomussalme, Ristijärveä, Puolankaa, Pudasjärveä ja Iitä (Evira 2016c). Lapin aluehallintoviraston alue ja Ahvenanmaa eivät kuulu keräilyalueeseen (Evira 2016c).

Kun pernaruttodiagnoosi on varmistunut, tehdään päätös taudin hävittämiseksi tilalta (MMM 24/2013, 6 §). Kaikki eläinperäiset tuotteet, sivutuotteet ja jätteet hävitetään tai käsitellään niin, että *B. anthracis* -bakteerit ja itiöt tuhoutuvat. Rakennukset, joissa sairaita eläimiä on pidetty, tulee puhdistaa ja desinfioida. Myös maa-alueet, joista tartunta on voitu saada, käsitellään siten, että bakteerit ja itiöt tuhoutuvat. Jos maa-alueita ei voida desinfioida, alueen käyttö kielletään sellaiseen tarkoitukseen, joka voi levittää pernaruttoa. Myös kuolleista eläimistä valunut veri ja eritteet on desinfioitava (MMM 24/2013, 6 §). Pernaruttoitiöitä tuhoavia desinfiointiaineita ovat esimerkiksi formaldehydi, glutaraldehydi, vetyperoksidi ja peretikkahappo. Vetyperoksidi ja peretikkahappo eivät kuitenkaan sovellu verellä kontaminoituneiden esineiden ja alueiden desinfioimiseen (WHO 2008).

6.2. Tautitapaukset Suomessa

Pernarutto oli Suomessa yleinen tauti 1960-luvulle saakka (Kivelä 1993). 1940-luvulla Suomessa todettiin 111 pernaruttotapausta. 1950-luvulla pernaruttotapauksia todettiin 142 kappaletta, mutta tapausten määrä alkoi vähentyä vuosikymmenen loppupuolella (Kivelä 1993). 1960-luvulla pernaruttotapauksia raportoitiin enää 27 kappaletta. 1970–1980-luvuilla tautitapauksia oli yhteensä kaksi, yksi kumpanakin vuosikymmenenä (Kivelä 1993). 2000-luvulla Suomessa on tavattu pernaruttoa kaksi kertaa: vuosina 2004 ja 2008 (Evira 2009, THL 2010, Andersson ym. 2011).

Pernaruttoa on tavattu eniten Varsinais-Suomessa, Satakunnassa, Kanta-Hämeessä, Pirkanmaalla, Pohjanmaalla ja Uudellamaalla. Muilla alueilla tautitapauksia on ollut suhteellisen vähän. Ahvenanmaa on ainoa maakunta, jossa pernaruttoa ei ole ollut lainkaan vuodesta 1940 alkaen (Kivelä 1993).

Vuosina 1940–2008 pernaruttoon sairastuneista eläimistä 49,6 % (306 kpl) on ollut nautoja (Kivelä 1993, Ajankohtaista EELA:sta 2004, Andersson ym. 2011). Nautoja sairastui keskimäärin 1,5 taudinpurkausta kohden (Kivelä 1993). Pernaruttoon sairastuneista eläimistä 42,1 % (260 kpl) on ollut minkkejä. Suurta lukua selittää se, että vuonna 1963 rehusekoittamolle

päättyi pernaruttoa sairastava nauta, ja tartunta levisi rehun mukana 25:lle minkkitarhalle. Minkkejä kuoli kontaminoituneen rehun takia yhteensä 185 (Kivelä 1993). Pernaruttoa on todettu Suomessa myös 38:lla hevosella, yhdeksällä sialla, kahdella lampaalla ja kahdella koiralla (Kivelä 1993).

Pernaruton esiintymisessä ei ole ollut Suomessa selvää vuodenaikaisvaihtelua, vaan tapaukset jakautuvat melko tasaisesti ympäri vuoden (Kivelä 1993).

Suomessa on tavattu pernaruttoa viimeksi vuosina 2004 ja 2008 samalla Etelä-Suomessa sijaitsevalla karjatilalla (THL 2010). Vuonna 2004 tilalla kuoli kaksi nautaa, ja tartunnan syyksi epäiltiin itiöiden kontaminoimaa rehua (Ajankohtaista EELA:sta 2004, THL 2010). Vuonna 2008 tilalla sairastui sonni, jolla havaittiin kuumetta, ruokahaluttomuutta ja nesteen kertymistä kivespussiin (Evira 2009, Andersson ym. 2011). Sonnia hoidettiin penisilliinillä, mutta lääke ei auttanut kivesten turvotukseen, joten kivespussin nesteestä tehtiin bakteeriviljely. Viljelyssä havaittiin nonhemolyyttistä, *Bacillus cereus* -bakteerin kaltaista kasvua. Diagnoosi varmistui pernarutoksi Evirassa, ja sonni päädyttiin lopettamaan (Andersson ym. 2011).

Tekemäni kartta Suomen pernaruttotapauksista (Liite 1) pohjautuu Sirkka-Liisa Kivelän (nyk. Korpenfelt) keräämään aineistoon, joka perustuu Valtion eläinlääketieteellisen laitoksen (VELL, nykyään Evira) bakteriologian osaston diaarikirjoihin, eläinlääkäreiden tekemiin läheteisiin ja bakteriologisiin näytteisiin sekä Maa- ja metsätalousministeriön eläinlääkintäosaston (MMEO, nykyään Maa- ja metsätalousministeriön ruokaosaston eläin- ja kasviterveyden yksikkö) tarttuvien tautien diaarikirjoihin ja eläinlääkäreiden lähettämiin toimitusilmoituksiin. VELL:n aineistossa pernaruttodiagnoosi oli varmistettu bakteriologisesti, ja MMEO:n aineistossa diagnoosin oli tehnyt paikallinen eläinlääkäri (Kivelä 1993). Tiedot vuosien 2004 ja 2008 tautitapauksista on saatu Eläinlääkärilehdestä (Ajankohtaista EELA:sta 2004), Eviran Eläintaudit Suomessa 2008 -julkaisusta (Evira 2009), Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen Tartuntataudit Suomessa -raportista (THL 2010) sekä vuonna 2008 sairastuneesta sonnista kirjoitetusta tapauselostuksesta (Andersson ym. 2011).

Karttaa tehdessäni määrittelin samaksi taudinpurkaukseksi kaikki tautitapaukset, jotka ilmenivät samalla tilalla kolmen viikon (21 vuorokauden) sisällä. Pernaruton inkubaatioaika eli taudin itämisaika tartunnasta oireiden ilmenemiseen on eläimillä tyypillisimmin 3–7 vuorokautta, mutta voi vaihdella 1–20 vuorokauden välillä (WHO 2008). Maailman eläintautijärjestö OIE määrittelee pernaruton inkubaatioajaksi 20 vuorokautta, kun kyse on eläinten kansainvälisestä kaupasta (OIE 2017). Suomessa nautojen tavallisin infektiolähde on kontaminoitunut rehu (Ajankohtaista EELA:sta 2004), joten saman kasvukauden aikana

samalla tilalla ilmenneet tautitapaukset voivat kuitenkin olla yhteydessä toisiaan, vaikka tapausten välillä olisi pidempikin ajanjakso.

6.3. Pernaruton säilymiseen vaikuttavat tekijät Suomessa

6.3.1. Maaperä

Suomen maaperä on luontaisesti hapan (MYTVAS3 2014): peltojen pH on keskimäärin 5,7, ja maaperä pystyy vastustamaan happamoittavia tekijöitä huonosti. Sateet ja sulamisvedet aiheuttavat ravinteiden, kuten kalsiumin, magnesiumin ja kaliumin, huuhtoutumista etenkin keväisin ja syksyisin (MYTVAS3 2014). Myös typen käyttö lannoituksessa, kasvien ravinteidenotto ja fossiilisten polttoaineiden seurauksena syntyvät happamat sateet voivat laskea maaperän pH:ta (MYTVAS3 2014).

Maaperän happamoituminen heikentää viljelykasvien kasvua monella tavalla. Happamassa maassa vetyionit syrjäyttävät kasveille käyttökelpoisia ravinteita maahiukkasten pinnalta, mikä puolestaan lisää ravinteiden huuhtoutumista pois kasvien juurien ulottuvilta. Esimerkiksi kalsiumin, magnesiumin ja kaliumin määrä vähenee maaperän pH:n laskiessa. Koska nurmi ja monet viljakasvit menestyvät parhaiten silloin, kun maaperän pH on 6–7, viljelysmaata kalkitaan Suomessa maaperän pH:n nostamiseksi. Kun maahiukkasten pinnalle kiinnittyneet vetyionit korvautuvat kalsiumioneilla, maaperän pH nousee. Lisäksi kalsium muuttaa maaperän mururakennetta siten, että veden läpäisevyys paranee (MYTVAS3 2014).

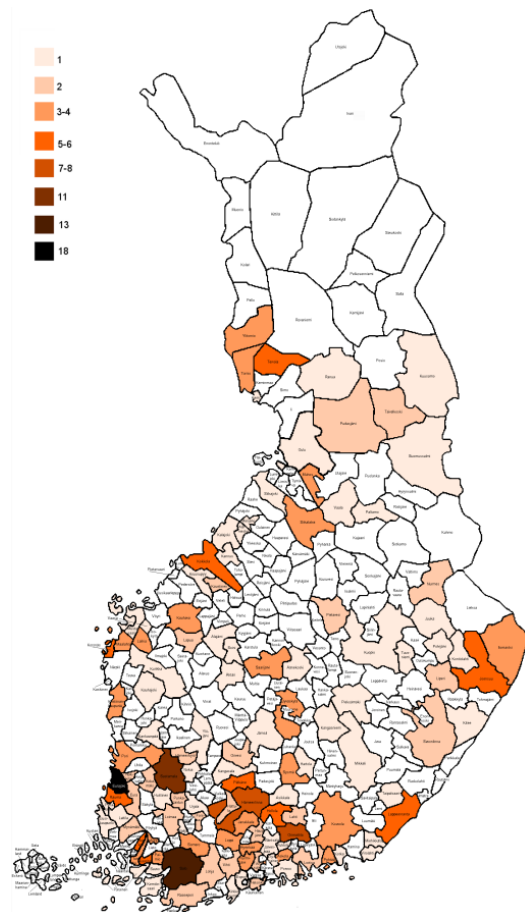
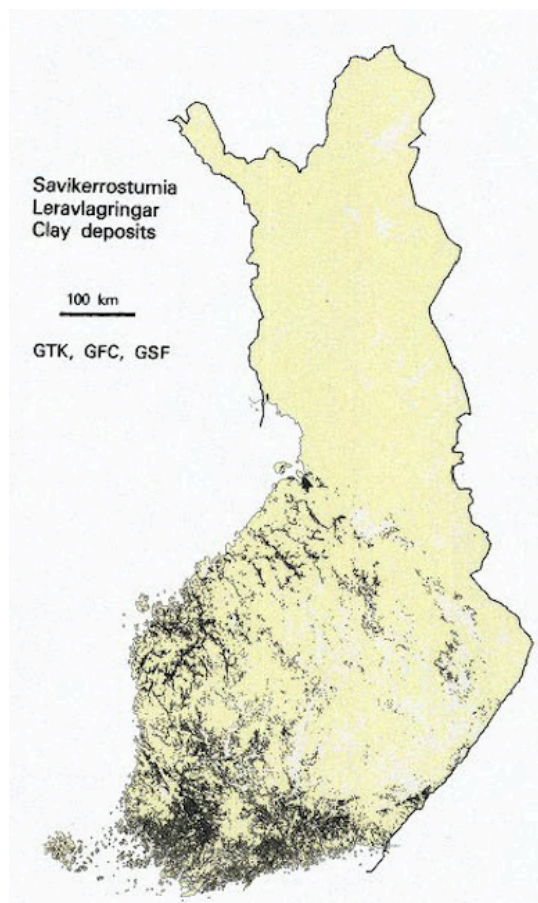
Kalsium on tärkeä osa *B. anthracis* -itiön ytimen rakennetta, joka suojaa itiötä muun muassa kuumuudelta ja UV-säteilyltä (katsauksessa Driks 2009). Viljelysmaan runsas kalkitseminen voikin edistää pernaruttoitiöiden säilymistä maaperässä. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen mukaan maanparannuskalkin käyttö on kuitenkin vähentynyt viime vuosikymmenten aikana tuottajahintojen laskemisen myötä (Myyrä ym. 2003).

Suomen yleisin maalaji on moreeni: lähes 60 % maaperän pintakerroksista on moreenin peittämää (Ronkainen 2012). Pohjamoreenia, joka on kerrostunut kallioperän päälle, on lähes kaikkialla Suomessa (Kujansuu & Niemelä 1984). Koska moreeni sisältää vain vähän ravinteita, siinä on orgaanista ainetta alle 20 % ja sen vedenpidätyskyky on heikko (Ronkainen ym. 2012), se ei ole ominaisuuksiltaan *B. anthracis* -itiöiden säilymistä edistävä. Etenkin Keski-Suomessa ja Savossa maaperä koostuu enimmäkseen moreenista (Kujansuu & Niemelä

1984). Rannikoilla moreenikerrostumat ovat keskimäärin ohuempia kuin sisämaassa (Ronkainen 2012).

Noin kolmasosa Suomen pelloista luokitellaan savimaiksi (Luke 2017). Savimaissa on runsaasti ravinteita: negatiivisesti varautuneet maahiukkaset sitovat itseensä positiivisesti varautuneita kalsium-, magnesium-, kalium- ja natriumioneja. Savi sitoo myös kosteutta ja sille tyypillinen halkeilu lisää veden läpäisevyyttä maaperässä. Saven humuspitoisuus vaihtelee 2–20 prosentin välillä (teoksessa Korhonen ym. 1974). Savimaiden pH on Suomessa keskimäärin 6,25 (MYTVAS3 2014).

Suomen rannikkoalueilla Etelä- ja Lounais-Suomessa sekä Pohjanmaan rannikolla on laajoja, jopa 100 km leveitä savi- ja silttikerrostumia (Kujansuu & Niemelä 1984). Vertailtaessa karttoja Suomen savimaista ja pernaruttotaudinpurkauksista voidaan havaita, että suuri osa tautitapauksista sijoittuu Etelä- ja Lounais-Suomeen sekä Pohjanmaan rannikkolle, joiden maaperässä on runsaasti savikerrostumia. Itiöiden säilymistä edistävä savinen maaperä voikin olla yksi merkittävimmistä ympäristöperäisistä syistä siihen, miksi Suomen pernaruttotaudinpurkaukset ovat keskittyneet Etelä- ja Lounais-Suomeen sekä Pohjanmaalle.



Kuva 2 (vasemmalla). Savikerrostumat Suomessa (Kujansuu & Niemelä 1984).

Kuva 3 (oikealla). Pernaruton esiintyminen Suomessa vuodesta 1940 alkaen.

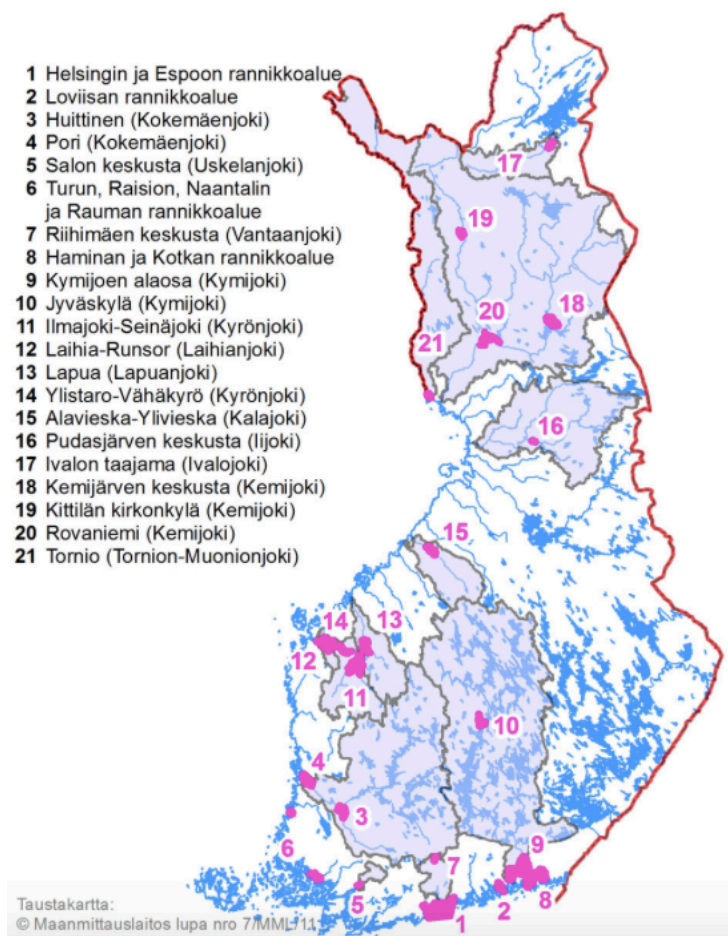
Myös runsas orgaanisen aineen määrä edistää pernaruttoitiöiden säilymistä maaperässä. Turvemaasta yli 75 % on eloperäistä ainetta (Iivonen 2008). Turvetta muodostuu kasvien hajotessa ja kerrostuessa vähähappiseen, kosteaan maahan (teoksessa Korhonen ym. 1974, Iivonen 2008). Turve muodostuu pääosin orgaanisista yhdisteistä, kuten humuksesta, ligniinistä ja hiilihydraateista (Iivonen 2008). Turvekerrostumat ovat Suomessa kohtalaisen yleisiä: niitä on eniten Pohjanmaalla, Kainuussa ja Lapissa (Kujansuu & Niemelä 1984). Turvemaiden osuus viljelyalasta on näillä alueilla noin 20–40 % (MMM 2017). Etelä-Suomessa turvekerrostumia on vähemmän (Luke 2017).

Turvekerrostumien ja pernaruton esiintymisen välillä ei näytä olevan kovin suurta yhteyttä Suomessa. Tämä saattaa selittyä sillä, että vaikka turvemaassa on runsaasti orgaanista ainetta, turpeen pH on luontaisesti alhainen (Iivonen 2008). Suomessa turvepeltomaan pH on keskimäärin alle 5,5 (MYTVAS3 2014). pH saattaakin olla orgaanisen aineksen määrää tärkeämpi tekijä *B. anthracis* -itiöiden maaperässä säilymisen kannalta.

6.3.2. Tulvat

Pernaruttotaudinpurkauksia on yhdistetty tulviin muun muassa Ruotsissa ja Australiassa (Durrheim ym. 2009, Lewerin ym. 2010). Suomessa on määriteltä 21 aluetta, joilla tulvimisen riski on erityisen suuri (MMM 2015). Helsingin, Espoon, Loviisan, Kotkan, Turun ja Porin rannikkoalueet ovat alttiita meren tulvimiselle, ja jokien tulvimisriskit ovat suuria muun muassa Etelä- ja Pohjois-Pohjanmaalla, Rovaniemellä ja Kemijärvellä (MMM 2015). Etenkin Pohjanmaan joet tulvivat herkästi, koska ne virtaavat laakeilla alueilla.

Suomessa pernaruttoa on tavattu eniten alueilla, joissa on savipitoinen maaperä ja kohonnut tulvariski. Tällaisia alueita ovat muun muassa Lounais- ja Etelä-Suomen sekä Pohjanmaan rannikot. Toisaalta joillakin tulvariskialueilla, kuten esimerkiksi Rovaniemellä ja Kemijärvellä, pernaruttoa ei ole tavattu lainkaan vuosina 1940–2008. Tulviminen voi kuitenkin olla yksi taudinpurkausten riskiä lisäävä tekijä alueilla, joilla tulvariski on kohonnut ja maaperä on koostumukseltaan itiöiden säilymistä edistävä.



Kuva 3. Merkittävät tulvariskialueet Suomessa (MMM 2015).

6.3.3. Ilmasto

Pernaruttoitiöt säilyvät pitkiä aikoja kylmässä (Almeida ym. 2008, Evira 2016a), mutta sporulaatio ja germinaatio voivat häiriintyä alhaisissa lämpötiloissa (Howie 1949, Titball & Manchee 1987). Suomessa maaperän vuoden keskilämpötila on vaihtelee mittausalueen perusteella 1,9 °C:sta 6,4°C:een puolen metrin syvyydeltä mitattuna (Yli-Halla & Mokma 1998). Kesällä maaperän keskilämpötila on 6,2–13,7 °C (Yli-Halla & Mokma 1998).

Kivelä (1993) ei havainnut yhteyttä vuodenaikojen ja taudinpurkauksien määrän välillä Suomessa. Suomen viileä ilmasto voisi kuitenkin vähentää taudinpurkausten määrää. Mikäli eläin sairastuu pernaruttoon kylmään vuodenaikaan, maaperään päätyneet vegetatiiviset bakteerit tuhoutuvat, mikäli niiden sporulaatio estyy alhaisen lämpötilan vuoksi. Yhtä lailla germinaatio vähenee alhaisissa lämpötiloissa. Toisaalta ilmaston lämpenemisen on arveltu lisäävän riskiä taudinpurkauksille arktisilla alueilla (Revich & Podalnaya 2011). Näin on käynyt esimerkiksi Jamalin Nenetsiassa Venäjällä (Evira 2016a).

6.3.4. Maaperän eliöt

Monet maaperässä elävät madot suosivat kalsiumpitoista ympäristöä (Curry 2004, Reich ym. 2005). Esimerkiksi *Eisenia fetida* -madot eli tunkiolierot, joiden ruuansulatuskanavan *B. anthracis* -bakteerit pystyvät asuttamaan (Schuch & Fischetti 2009), kasvoivat parhaiten maaperän pH:n ollessa noin 7 (Kaplan ym. 1980). Jicong ym. (2005) havaitsivat, että tunkiolierojen määrä maaperässä väheni suuresti, kun pH-arvo laski alle 6,5:n tai nousi yli 8,6:aan. Myös kosteissa maaperissä ja lammikoissa elävää *Acanthamoeba castellanii* -ameebaa tavataan Suomessa (Kalso ym. 1994). *Bacillus anthracis* -itiöt pystyvät germinoitumaan ja jakautumaan ameeban sisällä (Dey ym. 2012). Tunkiolierojen ja *Acanthamoeba castellanii* -ameeban merkitystä Suomen pernaruttotaudinpurkauksissa on vaikeaa arvioida. Tutkimuksissa havaittu maaperän eliöiden ja *B. anthracis* -bakteerin välinen symbioosi on kuitenkin huomionarvoinen asia.

6.3.5. Kasvillisuus

Festuca arundinacea -heinäkasvia eli ruokonataa käytetään Suomessa muun muassa laidunrehuna ja rehuseoksissa. Ruokonata tuottaa suuren sadon ja sillä on tiheä ja syväle ulottuva juuristo, jonka ansiosta se sietää hyvin myös kuivuutta (Wilman & Gao 1996).

Kasvista on kehitetty myös talvehtivia lajikkeita, mikä on lisännyt sen käyttöä Pohjois-Euroopassa (Saikkonen ym. 2016). Saile ja Koehler (2006) havaitsivat, että laboratorioolosuhteissa *B. anthracis* pystyi elämään vegetatiivisena ruokonatan juuriston vaikutuspiirissä olevassa maaperässä. Vaikka olosuhteet bakteerin selviämiseksi vegetatiivisessa muodossa eivät ole laboratorion ulkopuolella yhtä suotuisat, ruokonatan käyttö tuotantoeläinten rehuna voisi lisätä riskiä pernaruttoinfektion leviämiseen, jos pernaruttoon sairastuneesta eläimestä vapautuu bakteereja laidunmaahan. Toisaalta on mahdollista, että *B. anthracis* kykenee elämään monien muidenkin kasvien ritsosfäärissä tai edistämään niiden kasvua kuivilla aroilla elävän *Enneapogon desvauxii* -kasvin tavoin (Ganz ym. 2014). Asiasta tarvitaan kuitenkin lisää tutkimusta.

6.3.6. Muut tekijät

Pernaruttoitiöitä voi nousta maan pintakerrokseen esimerkiksi maansiirtotöiden yhteydessä (Bengis & Frean 2014). Metsien raivaamista pelloiksi alueilla, jossa maahan on aiemmin haudattu pernaruttoon kuolleita eläimiä, saattaa olla monien pernaruttotaudinpurkauksen taustalla myös Suomessa.

Myös haaskaeläimet ja hyönteiset voivat vaikuttaa pernaruton säilymiseen ympäristössä (Braack & de Vos 1990, Clegg ym. 2007, Mongoh ym. 2008, Bengis & Frean 2014). Haaskaeläinten ja hyönteisten merkitys taudin levittäjinä lienee kuitenkin suurempi alueilla, joilla pernarutto on endeeminen ja taudinpurkauksia esiintyy villieläimillä. Raadot kannattaa kuitenkin suojata haaskaeläimiltä Suomessakin, ja taudinpurkausten yhteydessä esimerkiksi karpästen määrän kontrollointi voi olla järkevää muiden vastustustoimenpiteiden ohella.

7. POHDINTA

Tämän liseniaatintutkielman ensimmäisenä tavoitteena oli perehtyä pernaruton ympäristössä säilymisestä löytyvään kirjallisuuteen sekä pohtia säilymiseen vaikuttavien tekijöiden merkitystä Suomessa. Tutkimuksissa on saatu viitteitä siitä, ettei *B. anthracis* välttämättä olekaan obligaatteja nisäkkäiden taudinaiheuttaja, vaan se voi säilyttää elinkykynsä myös muissa ympäristöissä. Monet *B. anthracis* -bakteerin säilymistä selvittäneet tutkimukset on kuitenkin tehty toistaiseksi vain laboratorio-olosuhteissa. *B. anthracis* -itiöt germinoituivat *Festuca arundinacea* -heinäkasvin ritsosfäärissä laboratorio-olosuhteissa (Saile & Koehler 2006), mutta kasvien juuristovyöhyke on monien muidenkin mikrobien suosima elinympäristö. *B. anthracis* -bakteeri on herkkä mikrobien väliselle kilpailulle (katsauksessa Dragon & Rennie 1995), joten laboratoriossa saadut tulokset eivät ainakaan täysin vastaa ympäristön ja maaperän olosuhteita. Laboratoriotutkimusten lisäksi tarvittaisiinkin jatkotutkimusta *B. anthracis* -bakteerin ja itiöiden säilymisestä kenttäolosuhteissa. Toisaalta bakteerien ja itiöiden eristäminen, konsentroiminen ja puhdistaminen maaperästä ei ole ongelmatonta, vaan luotettaville, nopeille ja edulliselle näytteenotto- ja käsittelymenetelmille olisi yhä tarvetta (Rao ym. 2010).

B. anthracis -bakteerin kyky selvitä isäntäeläimen ulkopuolella on sekä ajatuksena että tieteellisenä löydöksenä varsin uusi. Tästä syystä monia säilymiseen vaikuttavia tekijöitä on tutkittu vasta yhdessä tai kahdessa tutkimuksessa. Tutkimusten toistaminen olisikin tärkeää, jotta säilymiseen vaikuttavien tekijöiden merkitystä voidaan arvioida luotettavasti. Vaikka vegetatiivinen *B. anthracis* kykenee elämään isäntäeläimen ulkopuolella, pernaruttoinfektioiden ja taudin ympäristössä säilymisen kannalta itiöillä lienee kuitenkin suurempi merkitys. Toivottavasti *B. anthracis* -bakteerien ja itiöiden säilymistä erilaisissa olosuhteissa tutkitaan myös tulevaisuudessa.

Liseniaatintutkielman toisena tavoitteena oli tehdä kartta Suomessa ilmenneistä pernaruttotapauksista. Pernarutto on ollut Suomessa yleinen eläintauti 1900-luvun alkupuolella. Tämän liseniaatintutkielman puitteissa ei kuitenkaan ollut mahdollisuutta tarkastella Suomessa ennen vuotta 1940 ilmenneitä tautitapauksia. MMEO:n ja VELL:n arkistoihin perustuvassa aineistossa oli pernaruttotapauksia myös 1930-luvulta, mutta koska taudinpurkauksista tehty merkinnät olivat osin puutteellisia – kaikista tapauksista ei ollut kirjattu esimerkiksi paikkakuntaa – päätin jättää ennen vuotta 1940 ilmenneet tapaukset tutkielman ulkopuolelle. Koska *B. anthracis* -itiöt voivat säilyä maaperässä jopa kymmeniä tai satoja vuosia (Manchee 1981, De Vos 1990), taudinpurkauksia voikin tulevaisuudessa esiintyä

myös sellaisilla alueilla, joita ei ole merkitty tässä lisensiaatintutkielmassa tehtyyn karttaan. On myös mahdollista, etteivät kaikki taudinpurkaukset ole päätyneet eläinlääkäreiden tai viranomaisten tietoon. Näistä syistä johtuen ei voida olettaa, etteikö pernaruttoa voisi esiintyä myös karttaan merkittyjen alueiden ulkopuolella.

On myös huomioitava se, että vain VELL:n aineistossa pernaruttodiagnoosi on varmistettu bakteriologisesti, kun taas MMEO:n aineistossa diagnoosi oli paikallisen eläinlääkärin tekemä. Bakteriviljely on todennäköisesti kaikkein luotettavin tapa varmistua diagnoosista. Toisaalta voi olla, että esimerkiksi 1940–1950-luvuilla bakteriologisen tutkimuksen tekemiseen ei ole ollut samanlaisia resursseja ja mahdollisuuksia kuin nykypäivänä, joten eläinlääkärit ovat perustaneet diagnoosinsa muun muassa tyypillisiin klinisiin oireisiin, obduktiolöydöksiin sekä Giemsa-kapselivärykseen.

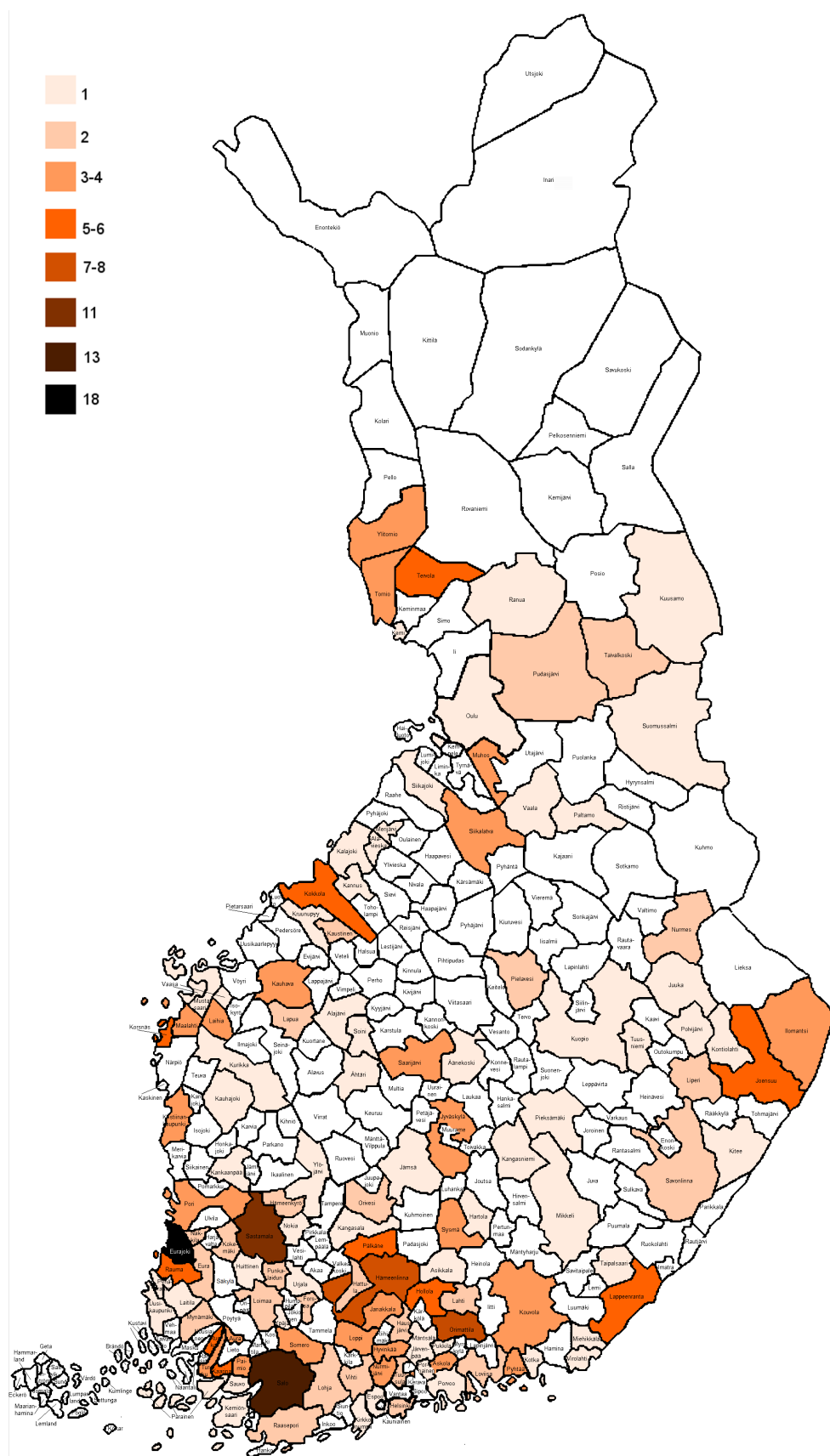
Kartta antaa aineiston asettamista rajoituksista huolimatta kuitenkin hyvän käsityksen siitä, missä pernaruttoa on esiintynyt Suomessa eniten ja missä tautia ei toisaalta ole tavattu lähes 80:een vuoteen. VELL:n ja MMEO:n aineiston perusteella taudinpurkausalueet olisi voinut merkitä karttaan tarkemmin, mutta yksityisyyden suojan vuoksi tautitapaukset on päädytty ilmoittamaan kuntatasolla.

Taudinpurkauskarttaa ja Suomen maaperäkarttaa tarkasteltaessa mielenkiintoisin havainto oli se, että pernaruttoa on esiintynyt eniten alueilla, joiden maaperässä on savikerrostumia. Savimaan kalsiumpitoisuus ja pH ovat korkeat, minkä on havaittu edistävän pernaruttoitiöiden säilymistä (Smith ym. 2000, Chen ym. 2016). On mahdollista, että Lounais- ja Etelä-Suomessa sekä Pohjanmaan rannikoilla on esiintynyt enemmän pernaruttoa siksi, koska olosuhteet maaperässä ovat olleet itiöiden säilymisen kannalta suotuisat. Tämän hypoteesin todentamiseen tarvittaisiin kuitenkin tarkempaa tutkimusta alueilla esiintyneiden taudinpurkausten epidemiologiasta.

On vaikeaa tehdä tarkkaa arvioita siitä, kuinka suuri merkitys muilla pernaruton säilymiseen vaikuttavilla tekijöillä on Suomessa. Yksi keino tautitapauksille alttiiden alueiden selvittämiseen olisikin *B. anthracis* -bakteerin ekologisen lokeron mallintaminen (Blackburn ym. 2007), jota ei ole vielä tehty Suomessa. Toisaalta ekologisen lokeron mallintamista on tehty enimmäkseen alueilla, joissa pernarutto on endeeminen (Chikerema ym. 2013, Mullins ym. 2013, Blackburn ym. 2015). Olisikin mielenkiintoista nähdä, kuinka tarkasti taudinpurkauksia voitaisiin ennustaa Suomessa, jossa pernaruttoa esiintyy vain sporadisesti. Mallinnus voitaisiin tehdä koko Suomen tasolla tai keskittää alueille, joilla pernaruttoa on tavattu eniten.

Pernaruttoa esiintyy Suomessa enää harvakseltaan, mutta koska itiöt voivat säilyä maaperässä pitkään, taudista on vaikeaa päästä kokonaan eroon. Tästä syystä on tärkeää, että eläinlääkärit osaavat epäillä pernaruttoa sen kohdatessaan. Myös taudinkuvaltaan epätyypillinen tapaukset, joita on tavattu 2000-luvulla muun muassa Suomessa ja Ruotsissa (Lewerin ym. 2010, Andersson ym. 2011), voivat vaikeuttaa taudin tunnistamista. Eläinlääkäreiden kouluttamisella ja ohjeistamisella sekä lakiin perustuvilla vastustustoiminpiteillä voidaan kuitenkin varmistaa, että pernarutto tunnistetaan eikä tauti pääse leviämään silloin, kun taudinpurkauksia esiintyy. Tällöin myös ympäristöön vapautuvien itiöiden määrä jää mahdollisimman vähäiseksi.

Liite 1. Kartta: Pernaruton esiintyminen Suomessa vuodesta 1940 alkaen.



Liite 2. Eviran ohje eläinlääkäreille pernaruttoa epäiltäessä (Evira 2017).

Eläinlääkäreille

USEIN KYSYTTYÄ PERNARUTOSTA

Mitä teen, jos kliinisessä tutkimuksessa tai puhelinkeskustelussa tulee mieleen pernarutto differentiaali diagnoosina?

Ole heti yhteydessä läänineläinlääkäriin (LEL). LEL päättää antamiesi tietojen perusteella toimenpiteistä, kustannusten maksamisesta, epäilyn vakavuusasteesta ja tarvitaanko rajoittavia määräyksiä. Sovi LEL kanssa siitä, millä lähettämistavalla ja mihin Eviraan näyte lähetetään, yleensä näyte tutkitaan lähimpänä sijaitsevassa Eviran toimipaikassa. Muista ilmoittaa näytteiden lähettämistavasta ja arvioidusta saapumisajasta Eviran laboratorioon sen jälkeen!

Millaiset oireet antavat aiheen epäillä pernaruttoa?

Taudin itämisaika on 4-10 päivää. Naudoilla ja muilla märehitijöillä taudinkuva on usein perakuutti; eläin löydetään kuolleena. Tyypillisiä oireita/obduktioliöydöksiä ovat korkea kuume, veren hyytymättömyys, verenvuodot ruumiinaukoista, ja voimakkaat ihonalaiset turvotukset, sekä suurentunut musta perna. Hevosilla ja sioilla oireina voi olla kuumeilua, ihonalaista turvotusta, koliikkioireita ja hengitysvaikeuksia.

Erityisesti, jos oireet viittaavat vahvasti pernaruttoon tai jos useampi eläin on kuollut, ole yhteydessä läänineläinlääkäriin. Tietoa Suomen pernaruttohistoriasta löytyy Zoonosikeskuksen nettisivulta. Tilalla ja alueella aiemmin, vuosikymmeniäkin sitten todettu pernarutto vahvistaa epäilyä.

Mitä näytteitä otetaan?

Ota näytteet tarpeellista varovaisuutta noudattaen, sillä kyseessä on zoonoosi. Käytä kertakäyttöisiä suojia (mm. hanskat). Varo ettet pölyytä eritteitä hengitysilmaan.

Pernaruttoepäilyeläintä ei saa avata tilalla eikä lähettää avattavaksi laboratorioon. Lähetä näytteeksi kokoverta ilman antikoagulanttia. Ota verinäyte vakuumputkeen, näytemäärän tulisi olla yli puoli millilitraa. Jos imet näytteen kertakäyttöruiskuun, teippaa ruiskun mäntä liikkumattomaksi ja neula suojineen kiinni ruiskuun. Sulje ruisku neuloineen tiiviisti esim. näytteenottoputkeen.

Jos epäily herää raadonavauksen yhteydessä, ota elinnäytteeksi pala pernaa tai muiden elinten muuttuneita osia, ödemanestettä tai peritoneaalineestettä. Laita elinnäytteet kahteen päällekkäiseen muovipussiin tai esim. muovipurkkiin tai -putkeen. Keskeytä avaus näytteenoton jälkeen. Ruho eristetään ja peitetään tulosta odottaessa huolella esim. pressulla. Syrjäisellä alueella raadon voi haudata ja raatojen keräilyalueella keräilyn voi sopia siinä vaiheessa kun tutkimustulos on varmistunut kielteiseksi.

Miten näyte pakataan ja lähetetään?

Pakkaa esipakatut näytteet suojapahviin tai kääri ne esim. talouspaperiin ja sen jälkeen tiiviiseen muovipussiin. Kääri ulkopuolelle lisää imevää materiaalia ja päällimmäiseksi tukeva ulkopakkaus (pahvirasia tai styroxlaatikoon). Kesäaikana lisää pakettiin kylmävaraaja.

Jos kyseessä on virallinen eläintautiepäily, lähetetään näytteet pääsääntöisesti kuriiritoimituksena tai taksilla. Jos lähetät näytteet Matkahuollon kautta tai Postin pikapakettina, merkitse lähetys ohjeiden mukaisesti. Käytä Postin pikapaketissa keltamustaa teippiä ja koodia UN3373, kirjoita pakkaukseen teksti ”Biologinen näyte, kategoria B”.

Minkälainen lähete tarvitaan?

Käytä Eviran tuotantoeläinten tautitutkimuslähettää, jonka voi tulostaa Eviran nettisivuilta. Kuvaa oireet, milloin eläin on kuollut, onko hoidettu antibiootilla ja hoidon syy. Kuvaa tilan muiden eläinten oireet, jos niitä on ja esim. onko eläimillä kuumetta. Muista myös tilan erityiset tapahtumat lähiaikoina (esim. tulvat, kaivuutyöt kuten ojitukset) sekä tiedossa oleva pernaruttohistoria. Korvamerkin EU – tunnus tai muu tunniste, tilatunnus ja pitopaikkatunnus ovat pakollisia tietoja läheteessä. Muista kirjata tilan ja omat yhteystietosi, osoitteet, puhelinnumerot ja sähköpostiosoitteet sekä läänineläinlääkäriin nimi.

Mistä löydän eläintautilainsäädännön määräykset pernarutosta?

Maa- ja metsätalousministeriön asetus pernaruton vastustamisesta 24/2013

Mistä löydän Eviran ohjeet?

Pernarutto - Evira

LÄHTEET

- Aikembayev AM, Lukhnova L, Temiraliyeva G, Meka-Mechenko T, Pazylov Y, Zakaryan S, Denisov G, Easterday WR, Van Ert MN, Keim P, Francesconi SC, Blackburn JK, Hugh-Jones M, Hadfield T. Historical distribution and molecular diversity of *Bacillus anthracis*, Kazakhstan. *Emerg Infect Dis* 2010, 16:789–96.
- Ajankohtaista EELA:sta. Pernaruttotapaus nautilalla. *Suomen eläinlääkärilehti* 2004;110, 12.
- Almeida JL, Harper B, Cole KD. *Bacillus anthracis* spore suspensions: determination of stability and comparison of enumeration techniques. *J Appl Microbiol* 2008, 104:1442–8.
- Andersson MA, Friman M, Constantin C, Andersson M. An atypical *Bacillus anthracis* infection in a bull causing a symmetrically swollen scrotal SAC – a potential health hazard for veterinary surgeons. Conference Paper. *Reprod Domest Anim* 2011.
- Ariel N, Zvi A, Grosfeld H, Gat O, Inbar Y, Velan B. Search for potential vaccine candidate ORFs in the *B. anthracis* virulence plasmid pXO1-*in silico* and *in vitro* screening. *Infect Immun* 2002, 70:6817–6827.
- Ayotte JB, Parker KL, Arocena JM, Gillingham MP. Chemical composition of lick soils: Functions of soil ingestion by four ungulate species. *J Mammal* 2006, 87:878–888.
- Bai YM, Zhou XM, Smith DL. Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Science* 2003, 43:1774–1781.
- Bakken LB. Separation and purification of bacteria from soil. *Appl Environ Microbiol* 1985, 49:1482–1487.
- Barea JM, Pozo MJ, Azcón R, Azcón-Aguilar C. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot* 2005, 56:1761–78.
- Barro AS, Fegan M, Moloney B, Porter K, Muller J, Warner S, Blackburn JK. Redefining the Australian Anthrax Belt: Modeling the Ecological Niche and Predicting the Geographic Distribution of *Bacillus anthracis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2016, 10: e0004689. doi: 10.1371/journal.pntd.0004689
- Baweja RB, Zaman MS, Mattoo AR, Sharma K, Tripathi V, Aggarwal A, Dubey GP, Kurupati RK, Ganguli M, Chaudhury NK, Sen S, Das TK, Gade WN, Singh Y. Properties of *Bacillus anthracis* spores prepared under various environmental conditions. *Arch Microbiol* 2008, 189:71–79.
- Bengis RG & Frean J. Anthrax as an example of the One Health concept. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2014, 33:593–604.
- Blackburn JK, McNyset KM, Curtis A, Hugh-Jones ME. Modeling the Geographic Distribution of *Bacillus anthracis*, the Causative Agent of Anthrax Disease, for the Contiguous United States using Predictive Ecologic Niche Modeling. *Am J Trop Med Hyg* 2007, 77:1103–1110.

- Blackburn JK, Curtis A, Hadfield TL, O'Shea B, Mitchell MA, Hugh-Jones ME. Confirmation of *Bacillus anthracis* from flesh-eating flies collected during a West Texas anthrax season. *J Wildlife Dis* 2010, 46:918–922.
- Blackburn JK, Hadfield TL, Curtis AJ, Hugh-Jones ME. Spatial and Temporal Patterns of Anthrax in White-Tailed Deer, *Odocoileus virginianus*, and Hematophagous Flies in West Texas during the Summertime Anthrax Risk Period. *Ann Assoc Am Geogr* 2014a, 939–958.
- Blackburn JK, Van Ert M, Mullins JC, Hadfield TL, Hugh-Jones ME. The necrophagous fly anthrax transmission pathway: empirical and genetic evidence from wildlife epizootics. *Vector Borne Zoonot* 2014b, 14:576–83.
- Blackburn JK, Skrypnyk A, Bagamian KH, Nikolich MP, Bezymennyi M, Skrypnyk V. Anthrax in a backyard domestic dog in Ukraine: a case report. *Vector Borne Zoonot* 2014c, 14(8):615–7.
- Blackburn JK, Odugbo MO, Van Ert M, O'Shea B, Mullins J, Perrenten V, Maho A, Hugh-Jones M, Hadfield T. *Bacillus anthracis* Diversity and Geographic Potential across Nigeria, Cameroon and Chad: Further Support of a Novel West African Lineage. *PLoS Negl Trop Dis* 2015, 9: e0003931. doi: 10.1371/journal.pntd.0003931.
- Bozue J, Moody KL, Cote CK, Stiles BG, Friedlander AM, Welkos SL, Hale ML. *Bacillus anthracis* spores of the bclA mutant exhibit increased adherence to epithelial cells, fibroblasts, and endothelial cells but not to macrophages. *Infect Immun* 2007a, 75:4498–4505.
- Bozue J, Cote CK, Moody KL, Welkos SL. Fully virulent *Bacillus anthracis* does not require the immunodominant protein BclA for pathogenesis. *Infect Immun* 2007b, 75:508–511.
- Braack LEO & de Vos V. Feeding habits and flight range of blow flies (*Chrysomya* spp.) in relation to anthrax transmission in the Kruger National Park, South Africa. *Onderstepoort J Vet* 1990, 57:141–142.
- Bradley KA, Mogridge J, Mourez M, Collier RJ, Young JAT. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 2001, 414:225–229.
- Braun P, Grass G, Aceti A, Serrecchia L, Affuso A, Marino L, Grimaldi S, Pagano S, Hanczaruk M, Georgi E, Northoff B, Schöler A, Schlöter M, Antwerpen M, Fasanella A. Microevolution of Anthrax from a Young Ancestor (M.A.Y.A.) Suggests a Soil-Borne Life Cycle of *Bacillus anthracis*. *PLoS One* 2015, 10: e0135346. doi: 10.1371/journal.pone.0135346.
- Brunsing RL, La Clair C, Tang S, Chiang C, Hancock LE, Perego M, Hoch JA. Characterization of Sporulation Histidine Kinases of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 2005, 187:6972–698.
- Buhr TL, Young AA, Barnette HK, Minter ZA, Kennihan NL, Johnson CA, Bohmke MD, DePaola M, Cora-Laó M, Page MA. Test methods and response surface models for hot, humid air decontamination of materials contaminated with dirty spores of *Bacillus anthracis* ΔSterne and *Bacillus thuringiensis* Al Hakam. *J Appl Microbiol* 2015, 119:1263–77.

- Candela T, Fouet A. *Bacillus anthracis* CapD, belonging to the gamma-glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. *Mol Microbiol* 2005, 57:717–26.
- Candela T, Fouet A. Poly- γ -glutamate in bacteria. *Mol Microbiol* 2006, 60:1091–1098.
- Cendrowski S, MacArthur W, Hanna P. *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. *Mol Microbiol* 2004, 51:407–17.
- Chen G, Driks A, Tawfiq K, Mallozzi M, Patil S. *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis* spore surface properties and transport. *Colloid Surface B* 2010, 76:512–8.
- Chen WJ, Lai SJ, Yang Y, Liu K, Li XL, Yao HW, Li Y, Zhou H, Wang LP, Mu D, Yin WW, Fang LQ, Yu HJ, Cao WC. Mapping the Distribution of Anthrax in Mainland China, 2005–2013. *PLoS Negl Trop Dis* 2016, 10:e0004637. doi: 10.1371/journal.pntd.0004637.
- Chikerema SM, Murwira A, Matope G, Pfukenyi DM. Spatial modelling of *Bacillus anthracis* ecological niche in Zimbabwe. *Prev Vet Med* 2013, 111:25–30.
- Chitlaru T, Zaide G, Ehrlich S, Inbar I, Cohen O, Shafferman A. HtrA is a major virulence determinant of *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* 2011, 81:1542–59.
- Christie G, Götzke H, Lowe CR. Identification of a receptor subunit and putative ligand-binding residues involved in the *Bacillus megaterium* QM B1551 spore germination response to glucose. *J Bacteriol* 2010, 192:4317–26.
- Clegg SB, Turnbull PCB, Foggin CM, Lindeque PM. Massive outbreak of anthrax in wildlife in the Malilangwe Wildlife Reserve, Zimbabwe. *Vet Rec* 2007, 160:113–118.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284:1318–22.
- Curry JP. Factors affecting the abundance of earthworms in the soil. Teoksessa: C. A. Edwards (toim.) *Earthworm ecology*, 2.p. 2004. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, Yhdysvallat. 91–113.
- Daffonchio D, Cherif A, Brusetti L, Rizzi A, Mora D, Boudabous A, Borin S. Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69:5128–5137.
- Davies DG. The Influence of temperature and humidity on spore formation and germination in *Bacillus anthracis*. *J Hyg-Camb* 1960, 58:177–186.
- De Vos V. The ecology of anthrax in Kruger National Park, South Africa. *Salisbury Med Bull Suppl* 1990, 68:19–23.
- Deuquet J, Lausch E, Superti-Furga A, van der Goot FG. The dark sides of capillary morphogenesis gene 2. *EMBO J* 2012, 31:3–13.
- Dey R, Hoffman PS, Glomski JJ. Germination and amplification of anthrax spores by soil-dwelling amoebas. *Appl Environ Microbiol* 2012, 78:8075–81.
- Doganay M, Metan G, Alp E. A review of cutaneous anthrax and its outcome. *J Infect Public Health* 2010, 3:98–105.

Dragon DC & Rennie RP. The ecology of anthrax spores: Tough but not invincible. *Can Vet J* 1995, 36:295–301.

Dragon DC, Elkin BT, Ellsworth TR. A review of anthrax in Canada and implications for research on the disease in northern bison. *J Appl Microbiol* 1999, 87:208–13.

Driks A. Maximum shields: the armor plating of the bacterial spore. *Trends Microbiol* 2002, 10:251–254.

Driks A. The *Bacillus anthracis* spore. *Mol Aspects Med* 2009, 30:368–73.

Duesbery NS, Webb, CP, Leppla SH, Gordon VM, Klimpel KR, Copeland TD, Ahn NG, Oskarsson MK, Fukasawa K, Paull KD. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* 1998, 280:734–737.

Durrheim DN, Freeman P, Roth I, Hornitzky M. Epidemiologic Questions from Anthrax Outbreak, Hunter Valley, Australia. *Emerg Infect Dis* 2009, 15:840–842.

EPNa 999/2001. Euroopan parlamentin ja neuvoston asetukset (EY) N:o 999/2001 tiettyjen tarttuvien spongiformisten enkefalopatioiden ehkäisyä, valvontaa ja hävittämistä koskevista säännöistä. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/?uri=celex:32001R0999>, haettu 28.10.2017.

Evira 2009. Eläintaudit Suomessa 2008. Eviran julkaisuja 7/2009. <http://www.virtuaali.info/opetusmaatilat/27/file/Eläintaudit%20Suomessa%202008.pdf>, haettu 28.10.2017.

Evira 2016a. Pernaruttoa Etelä-Ruotsissa ja Venäjällä. <https://www.evira.fi/elaimet/elainlaakaripalvelut/saparo-uutiskirje-elainlaakareille/2016/saparo-uutiskirje-elainlaakareille-elokuu-2016/pernaruttoa-etela-ruotsissa-ja-venajalla/>, haettu 25.3.2017, päivitetty 12.8.2016.

Evira 2016b. Pernarutto eli anthrax. <https://www.evira.fi/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/usealle-elainlajille-yhteiset-taudit/pernarutto/>, haettu 31.3.2017, päivitetty 11.8.2016.

Evira 2016c. Märehtijät. <https://www.evira.fi/elaimet/elainsuojelu-ja-elainten-pito/kuolleet-elaimet/tuotantoelaimet/marehtijat/> haettu 8.11.2017, päivitetty 29.11.2016.

Evira 2017. Eläinlääkäreille: Usein kysyttyä pernarutosta. https://www.evira.fi/globalassets/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/usealle-elainlajille-yhteiset/usein_kysyttya_pernarutosta_2017.pdf, haettu 8.11.2017.

Fasanella A, Scasciamacchia S, Garofolo G, Giangaspero A, Tarsitano E, Adone R. Evaluation of the House Fly *Musca domestica* as a Mechanical Vector for an Anthrax. *PLoS One* 2010, 5:e12219. doi: 10.1371/journal.pone.0012219.

Fisher N, Hanna P. Characterization of *Bacillus anthracis* germinant receptors in vitro. *J Bacteriol* 2005, 187:8055–8062.

Foerster HF, Foster JW. Endotrophic calcium, strontium, and barium spores of *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 1966; 91:1333–1345.

- Frazier AA, Franks TJ, Galvin JR. Inhalational Anthrax. *J Thorac Imaging* 2006, 21:252–258.
- Friebe S, van der Goot FG, Bürgi J. The Ins and Outs of Anthrax Toxin. *Toxins* 2016, 10: 8.
- Ganz H, Turner W, Brodie E, Kusters M, Shi Y, Sibanda H, Torok T, Getz W. Interactions between *Bacillus anthracis* and plants may promote anthrax transmission. *PLOS Negl Trop Dis* 2014, 8:e2903. doi: 10.1371/journal.pntd.0002903
- Gat O, Mendelson I, Chitlaru T, Ariel N, Altboum Z. The solute-binding component of a putative Mn(II) ABC transporter (MntA) is a novel *Bacillus anthracis* virulence determinant. *Mol Microbiol* 2005, 58:533–51.
- Giorno R, Mallozzi M, Bozue J, Moody KS, Slack A, Qiu D, Wang R, Friedlander A, Welkos S, Driks A. Localization and assembly of proteins comprising the outer structures of the *Bacillus anthracis* spore. *Microbiology* 2009, 155:1133–1145.
- Glick BR. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 1995, 41:109–117.
- Goodman JW, Nitecki DE. Studies on the relation of a prior immune response to immunogenicity. *Immunology* 1967, 13:577–583.
- Gorantala J, Grover S, Rahi A, Chaudhary P, Rajwanshi R, Sarin NB, Bhatnagar R. Generation of protective immune response against anthrax by oral immunization with protective antigen plant-based vaccine. *J Biotechnol* 2014, 176:1–10.
- Green BD, Battisti L, Koehler TM, Thorne CB, Ivins BE. Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* 1985, 29:291–297.
- Hahn BL, Sharma S, Sohnle PG. Analysis of epidermal entry in experimental cutaneous *Bacillus anthracis* infections in mice. *J Lab Clin Med* 2005, 146:95–102.
- Hampson K, Lembo T, Bessell P, Auty H, Packer C, Halliday J, Beesley CA, Fyumagwa R, Hoare R, Ernest E, Mentzel C, Metzger KL, Mlengeya T, Stamey K, Roberts K, Wilkins PP, Cleaveland S. Predictability of anthrax infection in the Serengeti, Tanzania. *J Appl Ecol* 2011, 48:1333–1344.
- Himsworth CG. The danger of lime use in agricultural anthrax disinfection procedures. *Can Vet J* 2008, 49:1208–1210.
- Honkajoki 2013. Hinnasto. https://raatonetti.fi/site?node_id=24, haettu 26.10.2017.
- Houston DC, Cooper JE. The digestive tract of the Whiteback Griffon vulture and its role in disease transmission among wild ungulates. *J Wildl Dis* 1975, 11:306–313.
- Howie JW. Some factors governing the formation of spores in *Bacillus anthracis*. *Society for General Microbiology* 1949: proceedings, 3.
- Hugh-Jones ME, Hussaini SN. Anthrax in England and Wales 1963–72. *Vet Rec* 1975, 97:256–261.
- Hugh-Jones ME & de Vos V. Anthrax and wildlife. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2002, 21:359–383.

Hugh-Jones ME & Blackburn J. The ecology of *Bacillus anthracis*. Mol Aspects Med 2009, 30:356–67.

Iivonen S. Ympäristöturpeet ja niiden käyttö. Ruralia-instituutti. Raportteja 32. Helsingin yliopisto 2008.

<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/225276/Raportteja32.pdf?sequence=1>, haettu 26.10.2017.

Ireland JA, Hanna PC. Amino acid- and purine ribonucleoside-induced germination of *Bacillus anthracis* DeltaSterne endospores: gerS mediates responses to aromatic ring structures. J Bacteriol 2002, 184:1296–1303.

Jedrzejewski MJ, Setlow P. Comparison of the binuclear metalloenzymes diphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase and alkaline phosphatase: their mechanism of catalysis by a phosphoserine intermediate. Chem Rev 2001, 101:607–618.

Jelacic TM, Chabot DJ, Bozue JA, Tobery SA, West MW, Moody K. Exposure to *Bacillus anthracis* capsule results in suppression of human monocyte-derived dendritic cells. Infect Immun 2014, 82:3405–3416.

Jicong H, Yanyun Q, Guangqing L, Dong R. The Influence of Temperature, pH and C/N Ratio on the Growth and Survival of Earthworms in Municipal Solid Waste. CIGR Journal 2005, 8. Kalso S, Jokipii L, Warhurst D, Vesaluoma M, Pönkä A, Tervo T. Vapaana elävien amebojen esiintyvyys pore- ja uima-allasvesissä – riski piilolasien käyttäjille. Duodecim 1994: 110.

Kaplan DL, Hartenstein R, Neuhauser FE, Malecki MR. Physicochemical requirements in the environment of the earthworm *Eisenia foetida*. Soil Biol Biochem 1980, 12:347–352.

Keppie J, Harris-Smith PQ, Smith H. The Chemical Basis of the Virulence of *Bacillus anthracis*. IX. Its Aggressins and their Mode of Action. Br J Exp Pathol 1963, 44:446–453.

Kivelä, Sirkka-Liisa. Pernaruton esiintyminen eläimillä Suomessa vuosina 1940–1990. Syventävien opintojen tutkielma. 1993. Eläinlääketieteellinen korkeakoulu, Mikrobiologian ja epizootologian laitos.

Koehler TM, Dai Z, Kaufman-Yarbray M. Regulation of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene: CO₂ and a transacting element activate transcription from one of two promoters. J Bacteriol 1994, 176:586–95.

Korhonen K-H, Gardemeister R & Tammirinne M. Geotekninen maaluokitus. Geotekniikan laboratorio, tiedonanto 14. Valtion teknillinen tutkimuskeskus 1974.

Kracalik IT, Malania L, Tsertsvadze N, Manvelyan J, Bakanidze L, Imnadze P, Tsanova S, Blackburn JK. Evidence of local persistence of human anthrax in the country of Georgia associated with environmental and anthropogenic factors. PLoS Negl Trop Dis 2013, 7: e2388. doi: 10.1371/journal.pntd.0002388.

Kujansuu R & Niemelä J (toim.) Suomen maaperä. Geologian tutkimuskeskus 1984.

- Laaberki M-H & Dworkin J. Death and survival of spore-forming bacteria in the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Symbiosis* 2008, 46:95–100.
- Lee K, Costerton JW, Ravel J, Auerbach RK, Wagner DM, Keim P, Leid JG. Phenotypic and functional characterization of *Bacillus anthracis* biofilms. *Microbiology* 2007, 153:1693–701.
- Lewerin SS, Elvander M, Westermarck T, Hartzell LN, Norström AK, Ehre S, Knutsson R, Englund S, Andersson AC, Granberg M, Bäckman S, Wikström P, Sandstedt K. Anthrax outbreak in a Swedish beef cattle herd – 1st case in 27 years: Case report. *Acta Vet Scand* 2010, 52:7.
- Lindeque PM, Turnbull PC. Ecology and epidemiology of anthrax in the Etosha National Park, Namibia. *Onderstepoort J Vet Res* 1994, 61:71–83.
- Liu DW, Thomas JH. Regulation of a periodic motor program in *C. elegans*. *J Neurosci* 1994, 14:1953–62.
- Liu H, Bergman NH, Thomason B, Shallom S, Hazen A, Crossno J, Rasko DA, Ravel J, Read TD, Peterson SN, Yates J, Hanna PC. Formation and Composition of the *Bacillus anthracis* Endospore. *J Bacteriol* 2004, 186:164–178.
- Liu S, Zhang Y, Moayeri M, Liu J, Crown D, Fattah RJ, Wein AN, Yu ZX, Finkel T, Leppla SH. Key tissue targets responsible for anthrax toxin-induced-lethality. *Nature* 2013, 501:63–68.
- Lucy M, Reed E, Glick BR. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *A Van Leeuw J Microb* 2004, 86:1–25.
- Luonnonvarakeskus. Maannostietopalvelu.
https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/taloustohtori/maannostieto/vakioraportit/pintamaalajit_kansallinen_luokitus/pintamaa_suuralueittain, haettu 29.10.2017, päivitetty 10.4.2017.
- Maa- ja metsätalousministeriö. Manner-Suomen maaseudun kehittämisohjelma 2014–2020.
https://www.maaseutu.fi/globalassets/maaseutuohjelma/hyvaksytty-ohjelma_16.2.2017.pdf,
 haettu 8.11.2017, päivitetty 17.2.2017.
- Maa- ja metsätalousministeriö. Merkittävät tulvariskialueet ja hallintasuunnitelma-alueet (12/2015). <http://mmm.fi/documents/1410837/1516651/Tulvariskialueet.jpg/a6834b62-c301-4da5-a846-424621806436?t=1450357849000>, haettu 26.10.2017.
- MMM 24/2013. Maa- ja metsätalousministeriön asetus pernaruton vastustamisesta.
http://www.finlex.fi/data/normit/41538/D_47_MMMa_pernaruton_vastustamisesta_24_2013.pdf, haettu 26.3.2017.
- MMM 843/2013. Maa- ja metsätalousministeriön asetus vastustettavista eläintaukeista ja niiden luokittelusta. <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2013/20130843>, haettu 26.3.2017.
- MMM 1010/2013. Maa- ja metsätalousministeriön asetus eläintautien ilmoittamisesta ja mikrobikantojen toimittamisesta. <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2013/20131010>, haettu 26.3.2017.

- Maatalouden ympäristötuen vaikuttavuuden seurantatutkimus (MYTVAS3) 2014. Loppuraportti.
http://mmm.fi/documents/1410837/1720628/MMM_myrtvas_loppuraportti_WEB.pdf/2cc8f041-82f2-4bbf-85e3-bd4a8d6964b3, haettu 29.10.2017.
- Makino S, Uchida I, Terakado N, Sasakawa C, Yoshikawa M. Molecular Characterization and Protein-Analysis of the Cap Region, Which Is Essential for Encapsulation in *Bacillus Anthracis*. J Bacteriol 1989, 171:722–730.
- Makino S, Watarai M, Cheun HI, Shirahata T, Uchida I. Effect of the lower molecular capsule released from the cell surface of *Bacillus anthracis* on the pathogenesis of anthrax. J Infect Dis 2002, 186:227–233.
- Manchee RJ, Broster MG, Melling J, Henstridge RM, Stagg AJ. *Bacillus anthracis* on Gruinard Island. Nature 1981, 294:254–255.
- Mikesell P, Ivins BE, Ristroph JD, Dreier TM. Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. Infect Immun 1983, 39:371–376.
- Minett FC. Sporulation and viability of *B. anthracis* in relation to environmental temperature and humidity. J Comp Pathol 1950, 60:161–176.
- Mongkolthanaruk W, Cooper GR, Mawer JS, Allan RN, Moir A. Effect of amino acid substitutions in the GerAA protein on the function of the alanine-responsive germinant receptor of *Bacillus subtilis* spores. J Bacteriol 2011, 193:2268–75.
- Mongoh MN, Dyer NW, Stoltenow CL, Khaita ML. Risk factors associated with anthrax outbreak in animals in North Dakota, 2005: A retrospective case-control study. Public Health Rep 2008, 123:352–359.
- Mullins J, Lukhnova L, Aikimbayev A, Pazilov Y, Van Ert M, Blackburn JK. Ecological niche modelling of the *Bacillus anthracis* A1.a sub-lineage in Kazakhstan. BMC Ecol 2011, 11:32.
- Mullins JC, Garofolo G, Van Ert M, Fasanella A, Lukhnova L, Hugh-Jones ME, Blackburn JK. Ecological niche modeling of *Bacillus anthracis* on three continents: evidence for genetic-ecological divergence? PLoS One 2013, 8: e72451. doi: 10.1371/journal.pone.0072451.
- Muoria PK, Muruthi P, Kariuki WK, Hassan BA, Mijele D, Ogue NO. Anthrax outbreak among Grevy's zebra (*Equus grevyi*) in Samburu, Kenya. Afr J Ecol 2007, 45:483–489.
- Myyrä S, Ketoja E, Yli-Halla M. Pellon hallintaoikeuden yhteys maanparannuksiin - esimerkkinä kalkitus ja fosforilannoitus. MTT:n selvityksiä 2003, nro 37.
- Nicholson WL. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. Cell Mol Life Sci 2002, 59:410–6.
- Nishi JS, Dragon DC, Elkin BT, Mitchell J, Ellsworth TR & Hugh-Jones ME. Emergency response planning for anthrax outbreaks in bison herds of northern Canada. Ann N Y Acad Sci 2002, 969:245–50.
- OIE Terrestrial Manual 7th Edition. Anthrax. OIE Listed Diseases And Other Diseases of Importance. Osa 2. Luku 2.1.1. 2012, 87–97.

OIE. Terrestrial Animal Health Code 2017. Luku 8: Anthrax.
<https://www.oie.int/doc/ged/D12825.PDF>, haettu 28.10.2017.

Owen JL, Yang T, Mohamadzadeh M. New insights into gastrointestinal anthrax infection. *Trends Mol Med* 2015, 21:154–63.

Peterson AT. Predicting species' geographic distributions based on ecological niche modeling. *Condor* 2001, 103:599–605.

Piris-Gimenez A, Corre JP, Jouvion G, Candela T, Khun H, Goossens PL. Encapsulated *Bacillus anthracis* interacts closely with liver endothelium. *J Infect Dis* 2009, 200:1381–1389.

Priest FG, Barker M, Baillie LW, Holmes EC, Maiden MC. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol* 2004, 186:7959–7970.

Rasko DA, Altherr MR, Han, CS & Ravel J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol Rev* 2005, 29:303–329.

Rao SS, Mohan KV, Atreya CD. Detection technologies for *Bacillus anthracis*: prospects and challenges. *J Microbiol Methods* 2010, 82:1–10.

Redmond C, Hall GA, Turnbull PCB, Gillgan JS. Experimentally assessed public health risks associated with pigs from farms experiencing anthrax. *Vet Rec* 1997, 141:244–247.

Reich PB, Oleksyn J, Modrzyński J, Mrozinski P, Hobbie SE, Eissenstat DM, Chorover J, Chadwick OA, Hale CM, Tjoelker MG. Linking letter calcium, earthworms and soil properties: a common garden test with 14 tree species. *Ecol Lett* 2005, 8:811–818.

Ren D, Bedzyk LA, Setlow P, Thomas SM, Ye RW, Wood TK. Gene expression in *Bacillus subtilis* surface biofilms with and without sporulation and the importance of yveR for biofilm maintenance. *Biotechnol Bioeng* 2004, 86:344–64.

Revich BA, Podolnaya MA. Thawing of permafrost may disturb historic cattle burial grounds in East Siberia. *Global Health Action* 2011, 4:10.

Ronkainen N. Suomen maalajien ominaisuuksia. Suomen ympäristö 2/2012. Suomen ympäristökeskus.
https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/38773/SY2_2012_Suomen_maalajien_ominaisuksia.pdf, haettu 25.10.2017.

Rume FI, Affuso A, Serrecchia L, Rondinone V, Manzulli V, Campese E, Di Taranto P, Biswas PK, Ahsan CR, Yasmin M, Fasanella A, Hugh-Jones M. Genotype Analysis of *Bacillus anthracis* Strains Circulating in Bangladesh. *PLoS One* 2016, 11: e0153548. doi: 10.1371/journal.pone.0153548.

Saikkonen K, Phillips TD, Faeth SH, McCulley RL, Saloniemi I, Helander M. Performance of Endophyte Infected Tall Fescue in Europe and North America. *PloS One* 2016, 11:e0157382. doi: 10.1371/journal.pone.0157382.

Saile E & Koehler TM. *Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants. *Appl Environ Microbiol* 2006, 72:3168–3174.

- Schuch R, Fischetti VA. The Secret Life of the Anthrax Agent *Bacillus anthracis*: Bacteriophage-Mediated Ecological Adaptations. PLoS One 2009, 4:e6532. doi: 10.1371/journal.pone.0006532.
- Schuch R, Pelzek AJ, Kan S, Fischetti VA. Prevalence of *Bacillus anthracis*-like organisms and bacteriophages in the intestinal tract of the earthworm *Eisenia fetida*. Appl Environ Microbiol 2010, 76:2286–2294.
- Scobie HM, Rainey GJA, Bradley KA, Young JAT. Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. Proc Natl Acad Sci USA 2003, 100:5170–5174.
- Setlow B & Setlow P. Measurements of the pH within dormant and germinated bacterial spores. Proc Natl Acad Sci USA 1980, 77:2474–6.
- Setlow B, Atluri S, Kitchel R, Koziol-Dube K, Setlow P. Role of Dipicolinic Acid in Resistance and Stability of Spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-Protective α/β -Type Small Acid-Soluble Proteins. J Bacteriol 2006, 188:3740–3747.
- Setlow P. Spore germination. Curr Opin Microbiol 2003, 6:550–556.
- Shatalin K, Gusarov I, Avetisova E, Shataline Y, McQuade LE, Lippard SJ, Nudler E. *Bacillus anthracis* -derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 2008, 105: 1009–13.
- Shen Y, Lee YS, Soelaiman S, Bergson P, Lu D, Chen A, Beckingham K, Grabarek Z, Mrksich M, Tang WJ. Physiological calcium concentrations regulate calmodulin binding and catalysis of adenylyl cyclase exotoxins. EMBO J 2002, 21:6721–32.
- Siamudaala VM, Bwalya JM, Munang'andu HM, Sinyangwe PG, Banda F, Mweene AS, Takada A, Kida H. Ecology and epidemiology of anthrax in cattle and humans in Zambia. Jpn J Vet Res 2006, 54:15–23.
- Smith KL, DeVos V, Bryden H, Price LB, Hugh-Jones ME, Keim P. *Bacillus anthracis* diversity in Kruger National Park. J Clin Microbiol 2000, 38:3780–4.
- Sozhamannan S, Chute MD, McAfee FD, Fouts DE, Akmal A, et al. The *Bacillus anthracis* chromosome contains four conserved, excision-proficient, putative prophages. BMC Microbiol 2006, 6:34.
- Spencer RC. *Bacillus anthracis*. J Clin Pathol 2003, 56:182–187.
- Spotts Whitney EA, Beatty ME, Taylor Jr. TH. Inactivation of *Bacillus anthracis* spores. Emerg Infect Dis 2003, 9:623–627.
- Stiles CW. Isolation of the *Bacillus anthracis* from Spinose Ear Ticks *Ornithodoros megnini*. Am J Vet Res 1944, 5:318–319.
- Stockwell D, Peters D. The GARP modelling system: problems and solutions to automated spatial prediction. Int J Geogr Inf Sci 1999, 13:143–158.
- Swick MC, Koehler TM, Driks A. Surviving Between Hosts: Sporulation and Transmission. Microbiol Spectr 2016, 4. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0029-2015.

Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M. A collagen-like surface glycoprotein is a structural component of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Mol Microbiol* 2002, 45:169–178.

Sylvestre P, Couture-Tosi E & Mock M. Polymorphism in the collagen-like region of the *Bacillus anthracis* BclA protein leads to variation in exosporium filament length. *J Bacteriol* 2003, 185:1555–1563.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. Pernarutto. <https://www.thl.fi/fi/web/infektiaudit/taudit-jamikrobit/bakteeritaudit/pernarutto>, haettu 27.10.2017, päivitetty 10.5.2016.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. Tartuntataudit Suomessa 1995–2009. Hulkko T, Lyytikäinen O, Kuusi M, Seppälä S, Ruutu P. (toim.) Raportti 17/2010. <http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/80321/a4c2f994-438c-4f3e-9d72-7d0bf17f551c.pdf?sequence=1>, haettu 30.3.2017.

Terzi B, Turnbull PCB, Bellan SE, Beyer W. Failure of Sterne- and Pasteur-Like Strains of *Bacillus anthracis* to Replicate and Survive in the Urban Bluebottle Blow Fly *Calliphora vicina* under Laboratory Conditions. *PLoS One* 2014, 9: e83860. doi: 10.1371/journal.pone.0083860.

Tieteen termipankki 2015. Ekologinen lokero. http://tieteentermipankki.fi/wiki/Biologia:ekologinen_lokero haettu 18.11.2017, päivitetty 23.3.2015.

Titball RW, Manchee RJ. Factors affecting the germination of spores of *Bacillus anthracis*. *J Appl Bacteriol* 1987, 62:269–273.

Tonello F, Zornetta I. *Bacillus anthracis* Factors for Phagosomal Escape. *Toxins* 2012, 4:536–553.

Turell MJ, Knudson GB. Mechanical transmission of *Bacillus anthracis* by stable flies (*Stomoxys calcitrans*) and mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus*). *Infect Immun* 1987, 55:1859–1861.

Turnbull PCB, Diekmann M, Kilian JW, Versfeld W, de Vos V, Arntzen L, Wolter K, Bartels P & Kotze A. Naturally acquired antibodies to *Bacillus anthracis* protective antigen in vultures of southern Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 2008, 75:95–102.

Turner AJ, Falvin JW, Rubira RJ, Condrón RJ, Bradley T. Experiences with vaccination and epidemiological investigations on an anthrax outbreak in Australia in 1997. *J Appl Microbiol* 1999, 87:294–7.

Turner WC, Imologhome P, Havarua Z, Kaaya GP, Mfuni JKE, Mpofu IDT, Getz WM. Soil ingestion, nutrition and the seasonality of anthrax in herbivores of Etosha National Park. *Ecosphere* 2013, 4:1–19.

Turner WC, Kausrud KL, Krishnappa YS, Crooms JP, Ganz HH, Mapaure I, Cloete CC, Havarua Z, Küsters M, Getz WM, Stenseth NC. Fatal attraction: vegetation responses to nutrient inputs attract herbivores to infectious anthrax carcass sites. *Proc Biol Sci* 2014, 281. doi: 10.1098/rspb.2014.1785.

Turner WC, Kausrud KL, Beyer W, Easterday WR, Barandongo ZR, Blaschke E, Cloete CC, Lazak J, Van Ert MN, Ganz HH, Turnbull PC, Stenseth NC, Getz WM. Lethal exposure: An

integrated approach to pathogen transmission via environmental reservoirs. *Sci Rep* 2016, 6:27311.

U.S. EPA. Investigation Report: Investigation of simulated sunlight in the inactivation of *B. anthracis* and *B. subtilis* on outdoor materials. EPA/600/R-10/048. U.S. Environmental Protection Agency 2010, Washington, DC, Yhdysvallat.

U.S. EPA. Environmental Persistence of Vegetative *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis*. EPA/600/R-14/150. U.S. Environmental Protection Agency 2014, Washington, DC, Yhdysvallat.

Van Ert MN, Easterday WR, Huynh LY, Okinaka RT, Hugh-Jones ME, Ravel J, Zanecki SR, Pearson T, Simonson TS, U'Ren JM, Kachur SM, Leadem-Dougherty RR, Rhoton SD, Zinser G, Farlow J, Coker PR, Smith KL, Wang B, Kenefic LJ, Fraser-Liggett CM, Wagner DM, Keim P. Global Genetic Population Structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One* 2007, 2:e461.

Van Loon LC, Glick BR. Increased plant fitness by rhizobacteria. *Ecol Stud* 2004, 170:177–206.

Van Ness GB. Ecology of Anthrax. *Science* 1971; 172:1303–1307.

Vardharajula S, Zulfikar Ali S, Grover M, Reddy G, Bandi V. Drought- tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *J Plant Interact* 2011, 6:1–14.

Vodkin MH, Leppla SH. Cloning of the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. *Cell* 1983, 34:693–697.

Wall DH, Nielsen UN, Six J. Soil biodiversity and human health. *Nature* 2015, 528: 69–76.

Wang JY & Roehrl MH. Anthrax vaccine design: strategies to achieve comprehensive protection against spore, bacillus, and toxin. *Med Immunol* 2005, 4:4.

Weiner MA, Hanna PC. Macrophage-mediated germination of *Bacillus anthracis* endospores requires the gerH operon. *Infect Immun* 2003, 71:3954–3959.

WHO. In Anthrax in Humans and Animals, 4. p. International Office of Epizootics, Food, Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization 2008, Geneva, Sveitsi.

Williams G, Linley E, Nicholas R, Baillie L. The role of the exosporium in the environmental distribution of anthrax. *J Appl Microbiol* 2013, 114:396–403.

White AK, Hoch JA, Grynberg M, Godzik A, Perego M. Sensor domains encoded in *Bacillus anthracis* virulence plasmids prevent sporulation by hijacking a sporulation sensor histidine kinase. *J Bacteriol* 2006, 188:6354–6360.

White CP, Popovici J, Lytle DA, Adcock NJ, Rice EW. Effect of pH on the electrophoretic mobility of spores of *Bacillus anthracis* and its surrogates in aqueous solutions. *Appl Environ Microbiol* 2012, 78:8470–8473.

Wilman D & Gao Y. Herbage production and tiller density in five related grasses, their hybrids and mixtures. *J Agr Sci* 1996, 127:57–65.

Yi X, Setlow P. Studies of the commitment step in the germination of spores of *Bacillus* species. J Bacteriol 2010, 192:3424–3433.

Yli-Halla M, Mokma DL. Soil temperature regimes in Finland. Julkaisussa: Agr Food Sci Finland 1998, 7:507–512.

Zwick ME, Joseph SJ, Didelot X, Chen PE, Bishop-Lilly KA, Stewart AC, Willner K, Nolan N, Lentz S, Thomason MK, Sozhamannan S, Mateczun AJ, Du L, Read TD. Genomic characterization of the *Bacillus cereus sensu lato* species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. Genome Res 2012, 22:1512–24.